

AD

PCT/JP99/04092

29.07.99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

JP 99/4092

REC'D 08 OCT 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office. EJW

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1998年 7月29日

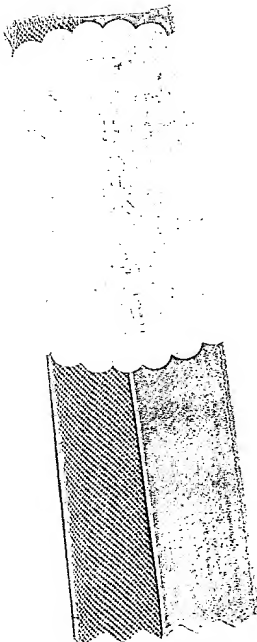
出 願 番 号  
Application Number:

平成10年特許願第213823号

出 願 人  
Applicant(s):

協和醗酵工業株式会社

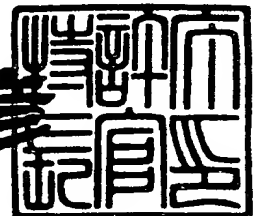
**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



1999年 9月24日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3064029

【書類名】 特許願

【整理番号】 H10-0981N2

【提出日】 平成10年 7月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/54

【発明の名称】 新規ポリペプチド

【請求項の数】 49

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都東大和市向原 5-1082-1

    【氏名】 成松 久

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都八王子市小比企町 482 ドミール山田 B208

    【氏名】 工藤 崇

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県相模原市相南 2-15-17 レオパレス相南 202

    【氏名】 佐々木 克敏

【特許出願人】

    【識別番号】 000001029

    【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

    【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 008187

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 要約書 1

    【物件名】 図面 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規ポリペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 糖鎖の非還元末端に存在する N-アセチルラクトサミン (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) 構造中の N-アセチルグルコサミン残基に  $\alpha$ 1,3結合でフコースを転移する活性を有し、かつ糖鎖の非還元末端に存在する  $\alpha$ 2,3-シアリル N-アセチルラクトサミン (NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) 構造中の N-アセチルグルコサミン残基に  $\alpha$ 1,3結合でフコースを転移する活性を有しないポリペプチド。

【請求項 2】 以下の (a)、(b) および (c) から選ばれるポリペプチド。

(a) 配列番号 1 または 2 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号 1 または 2 記載のアミノ酸配列の 56 番目から 359 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド

(c) (a) または (b) のポリペプチドの有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、糖鎖の非還元末端に存在する N-アセチルラクトサミン (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) 構造中の N-アセチルグルコサミン残基に  $\alpha$ 1,3結合でフコースを転移する活性を有し、かつ糖鎖の非還元末端に存在する  $\alpha$ 2,3-シアリル N-アセチルラクトサミン (NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) 構造中の N-アセチルグルコサミン残基に  $\alpha$ 1,3結合でフコースを転移する活性を有しないポリペプチド

【請求項 3】 糖鎖の非還元末端に存在する Gal $\beta$ 1-4GlcNAc 構造中の N-アセチルグルコサミン残基に  $\alpha$ 1,3結合でフコースを転移する活性がルイス x 糖鎖 [Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc] およびルイス y 糖鎖 [Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc] を合成する活性であり、糖鎖の非還元末端に存在する NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc 構造中の N-アセチルグルコサミン残基に  $\alpha$ 1,3結合でフコースを転移する活性がシアリルルイス x 糖鎖 [NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc] を合成する活性である、請求項 1 または 2 記載のポリペプチド。

【請求項 4】 以下の以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(

f)、(g) および (h) から選ばれる DNA。

(a) 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする DNA

(b) 配列番号 3 で表される塩基配列の 280 から 1194 番目の塩基配列を有する DNA

(c) 配列番号 3 で表される塩基配列の 115 から 1194 番目の塩基配列を有する DNA

(d) 配列番号 4 で表される塩基配列の 1454 から 2368 番目の塩基配列を有する DNA

(e) 配列番号 4 で表される塩基配列の 1289 から 2368 番目の塩基配列を有する DNA

(f) 配列番号 5 で表される塩基配列の 460 から 1374 番目の塩基配列を有する DNA

(g) 配列番号 5 で表される塩基配列の 295 から 1374 番目の塩基配列を有する DNA

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(f) および (g) の DNA から選ばれる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA であり、糖鎖の非還元末端に存在する N-アセチルラクトサミン (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) 構造中の N-アセチルグルコサミン残基に  $\alpha$ 1,3 結合でフコースを転移する活性を有し、かつ糖鎖の非還元末端に存在する  $\alpha$ 2,3-シアリル N-アセチルラクトサミン (NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) 構造中の N-アセチルグルコサミン残基に  $\alpha$ 1,3 結合でフコースを転移する活性を有しないポリペプチドをコードする DNA

【請求項 5】 請求項 4 記載の DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA。

【請求項 6】 組換え体 DNA が、プラスミド pAMo-mFT9 またはプラスミド pBS-hFT9 (S2) である、請求項 5 記載の組換え体 DNA

【請求項 7】 請求項 5 または 6 記載の組換え体 DNA を保有する形質転換体。



【請求項 8】 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、非ヒトトランスジェニック動物およびトランスジェニック植物から選ばれる形質転換体である、請求項 7 記載の形質転換体。

【請求項 9】 微生物が、Escherichia 属に属する微生物である、請求項 8 記載の形質転換体。

【請求項 10】 動物細胞が、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞およびヒト白血病細胞から選ばれる動物細胞である、請求項 8 記載の形質転換体。

【請求項 11】 昆虫細胞が、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞、Trichoplusia ni の卵巣細胞およびカイコの卵巣細胞から選ばれる昆虫細胞である、請求項 8 記載の形質転換体。

【請求項 12】 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA を保有する形質転換体を培養液中で培養し、該ポリペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【請求項 13】 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA を保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該ポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【請求項 14】 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、請求項 13 記載の製造法。

【請求項 15】 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA を保有するトランスジェニック植物を栽培し、該ポリペプチドを該植物中に生成蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【請求項 16】 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする DNA を用い、in vitroでの転写・翻訳系により該ポリペプチドを合成することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【請求項 17】 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを酵素源として用い、

(a) 該酵素源、

(b) i) N-アセチルラクトサミン ( $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ )、ii) N-アセチルラクトサミン構造を非還元末端に有するオリゴ糖、iii) N-アセチルラクトサミン構造を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質、iv) それらの N-アセチルラクトサミン構造が硫酸基で修飾された誘導体、および v) それらの N-アセチルラクトサミン構造が糖で修飾された誘導体であり、かつ該 N-アセチルラクトサミン構造中のガラクトース残基に  $\alpha 2,3$  結合でシアル酸が付加していない構造を有する誘導体から選ばれる受容基質、および

(c) グアノシン 5'-二リン酸フコース

を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質の N-アセチルラクトサミン構造中の N-アセチルグルコサミン残基に  $\alpha 1,3$  結合でフコースが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

【請求項 18】 誘導体が、 $\text{Fuc}\alpha 1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal}\alpha 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-2)\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{GalNAc}\alpha 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-2)\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}(6\text{SO}_3^-)$ 、これらオリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有する糖鎖、および該糖鎖を含有する複合糖質から選ばれる誘導体である、請求項 17 記載の製造法。

【請求項 19】 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを酵素源として用い、

(a) 該酵素源、

(b) i) ラクトース ( $\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ )、ii) ラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、iii) ラクトース構造を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質、iv) それ

らのラクトース構造が硫酸基で修飾された誘導体、およびv)それらのラクトース構造が糖で修飾された誘導体であり、かつ該ラクトース構造中のガラクトース残基に $\alpha 2,3$ 結合でシアル酸が付加していない構造を有する誘導体から選ばれる受容基質、および

(c) グアノシン 5' - ニリン酸フコース

を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のラクトース構造中のグルコース残基に $\alpha 1,3$ 結合でフコースが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

【請求項 20】 誘導体が、Gal  $\alpha 1-3$ Gal  $\beta 1-4$ Glc、Gal  $\alpha 1-3$ (Fuc  $\alpha 1-2$ )Gal  $\beta 1-4$ Glc、GalNAc  $\alpha 1-3$ (Fuc  $\alpha 1-2$ )Gal  $\beta 1-4$ Glc、Gal  $\alpha 1-4$ Gal  $\beta 1-4$ Glc、Gal  $\beta 1-4$ Glc(6SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)、これらオリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有する糖鎖、および該糖鎖を含有する複合糖質から選ばれる誘導体である、請求項 19 記載の製造法。

【請求項 21】 請求項 8 記載の微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞由来の形質転換体から選ばれる形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中にフコースが $\alpha 1,3$ 結合でN-アセチルグルコサミン残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

【請求項 22】 請求項 8 記載の非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、フコースが $\alpha 1,3$ 結合でN-アセチルグルコサミン残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該動物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または複合糖質の製造法。

【請求項 23】 請求項 8 記載のトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、フコースが $\alpha 1,3$ 結合でN-アセチルグルコサミン残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該植物中より該糖鎖または複合糖質を採取することを特徴とする

、該糖鎖または複合糖質の製造法。

【請求項 24】 複合糖質が、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リポ多糖、ペプチドグリカン、およびステロイド化合物等に糖鎖が結合した配糖体から選ばれる複合糖質である、請求項 17～23 のいずれか一つに記載の製造法。

【請求項 25】 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、請求項 22 記載の製造法。

【請求項 26】 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする DNA を用い、ハイブリダイゼーション法により、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

【請求項 27】 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする DNA、配列番号 3 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 4 で表される塩基配列を有する DNA および配列番号 5 で表される塩基配列を有する DNA から選ばれる DNA の有する塩基配列中の連続した 10～50 塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドの誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれるオリゴヌクレオチド。

【請求項 28】 誘導体オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合が N 3' - P 5' ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C-5 プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C-5 チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンが C-5 プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA 中のリボースが 2' - O - プロピルリボースで置

換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが 2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれる誘導体オリゴヌクレオチドである、請求項 27 記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 29】 請求項 27 または 28 記載のオリゴヌクレオチドを用い、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション法により、請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

【請求項 30】 請求項 26 または 29 記載の方法を用いた、脳疾患、腎疾患または癌の検出法。

【請求項 31】 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする DNA、配列番号 3 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 4 で表される塩基配列を有する DNA および配列番号 5 で表される塩基配列を有する DNA から選ばれる DNA を用い、請求項 1、2 または 3 記載のポリペプチドをコードする DNA の転写を抑制する方法。

【請求項 32】 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする DNA、配列番号 3 で表される塩基配列を有する DNA、配列番号 4 で表される塩基配列を有する DNA および配列番号 5 で表される塩基配列を有する DNA から選ばれる DNA を用い、請求項 1、2 または 3 記載のポリペプチドをコードする mRNA の翻訳を抑制する方法。

【請求項 33】 請求項 27 または 28 記載のオリゴヌクレオチドを用い、請求項 1、2 または 3 記載のポリペプチドをコードする DNA の転写を抑制する方法。

【請求項 34】 請求項 27 または 28 記載のオリゴヌクレオチドを用い、請求項 1、2 または 3 記載のポリペプチドをコードする mRNA の翻訳を抑制する方法。

【請求項 35】 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを認識する抗体。

【請求項 36】 請求項 35 記載の抗体を用いる、請求項 1、2 および 3

記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドの免疫学的検出法。

【請求項37】 請求項35記載の抗体を用い、請求項1、2および3記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを検出することを特徴とする、免疫組織染色法。

【請求項38】 請求項35記載の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

【請求項39】 請求項35記載の抗体を含有する、脳疾患、腎疾患または癌の診断薬。

【請求項40】 請求項1、2および3記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドと被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドの有する活性を変動させる物質のスクリーニング法。

【請求項41】 請求項1、2および3記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、抗ルイスx抗体または抗ルイスy抗体を用い、ルイスx糖鎖含量またはルイスy糖鎖含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

【請求項42】 請求項1、2および3記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、請求項35記載の抗体を用い、該ポリペプチド含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

【請求項43】 請求項1、2および3記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーターDNA。

【請求項44】 プロモーターDNAが、神経細胞、腎細胞、胃上皮細胞、白血球細胞、脳腫瘍細胞、神経芽細胞腫細胞、メラノーマ細胞、腎癌細胞、胃癌細胞、大腸癌細胞、および膀胱癌細胞から選ばれる細胞で機能しているプロモーターである、請求項43記載のプロモーターDNA。

【請求項45】 プロモーターDNAが、ヒトまたはマウス由来のプロモーターDNAである、請求項43または44記載のプロモーターDNA。

【請求項46】 請求項43、44および45記載のプロモーターDNAから選ばれるプロモーターDNAおよび該プロモーターDNAの下流に連結さ

せたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを用いて動物細胞を形質転換し、該形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することを特徴とする、該プロモータによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法。

【請求項 47】 レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子より選ばれる遺伝子である、請求項 46 記載のスクリーニング法。

【請求項 48】 請求項 1、2 および 3 記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする DNA を欠損または変異させたノックアウト非ヒト動物。

【請求項 49】 ノックアウト非ヒト動物がマウスである、請求項 48 記載のノックアウト非ヒト動物。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

##### 【発明の属する技術分野】

本発明は、新規  $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドをコードする DNA、該 DNA が組み込まれた組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドを認識する抗体、該ポリペプチドを用いたフコース含有糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造法、該組換え体ベクターを保有する形質転換体を用いたフコース含有糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造法に関する。

##### 【0002】

##### 【従来の技術】

フコース含有糖鎖は、発生・分化、細胞認識といった生命現象に関与しているほか、炎症、癌、感染症、自己免疫疾患、およびその他多くの病気の発生、進行に深く関係していると考えられている〔木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編，グリコバイオロジーシリーズ①～⑥，講談社，（1993年）、Glycobiology，

3, 97 (1993)]。

【0003】

フコース含有糖鎖は、タンパク質や脂質に付加して、糖タンパク質、プロテオグリカン、または糖脂質として存在するほか、オリゴ糖としても存在する。

フコース含有糖鎖の一つであるルイス x 糖鎖 [Gal  $\beta$  1-4 (Fuc  $\alpha$  1-3) GlcNAc] は、初期胚、脳、および腎臓の発生の過程で規則正しく出現する。また、ルイス x 糖鎖は互いに親和性を有することや、マウス初期胚の発生過程における細胞緊密化 (cell compaction) に関与することから、ルイス糖鎖が接着分子あるいは糖鎖シグナルとして作用し、初期胚、脳、および腎臓の発生に重要な役割を果たしていると考えられている。

【0004】

従って、それらの発生の過程で出現するルイス x 糖鎖の合成に関与する  $\alpha$  1, 3-フコース転移酵素の遺伝子をクローン化し、その役割を解析することにより、該遺伝子と遺伝性疾患等との関連を調べることが可能になる。

シアリルルイス x 糖鎖 [NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-4 (Fuc  $\alpha$  1-3) GlcNAc]、シアリルルイス a 糖鎖 [NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-3 (Fuc  $\alpha$  1-4) GlcNAc]、ルイス x 糖鎖およびルイス y 糖鎖 [Fuc  $\alpha$  1-2Gal  $\beta$  1-4 (Fuc  $\alpha$  1-3) GlcNAc] は、癌関連糖鎖として知られている。

【0005】

シアリルルイス a 糖鎖は、主に大腸癌や膵癌等の消化器系の癌において高頻度に検出される。一方、シアリルルイス x 糖鎖、ルイス x 糖鎖、ルイス y 糖鎖は、消化器系癌のほか、肺癌、卵巣癌、腎癌で検出される。

同じ糖鎖が出現する場合でも、該糖鎖の合成に関与する糖転移酵素は、細胞により異なることが明らかになっているため、例えばそれぞれの癌細胞においてルイス x 糖鎖の生合成に関与している  $\alpha$  1, 3-フコース転移酵素を同定し、特定の癌との相関を調べることにより、より正確な癌の診断が可能になると推定される。

【0006】

ルイス x 糖鎖は、該糖鎖を含有する糖タンパク質の血中におけるクリアラン



スや目的臓器へのターゲティングにも関与している。任意のタンパク質に人為的にルイス $\times$ 糖鎖を付加することにより、任意のタンパク質の血中クリアランス速度を制御したり、肝臓へのターゲティングを可能にすることができると考えられる [J. Biol. Chem., 270, 24024-24031(1995)]。

## 【0007】

また、ルイス $\times$ 糖鎖には、該糖鎖間での相互接着能があることが知られていることから [Glycoconjugate J., 11, 238-248(1994)、Glycobiology, 8, 139-146(1998)]、任意のタンパク質にルイス $\times$ 糖鎖を付加することにより、該タンパク質をルイス $\times$ 糖鎖を高発現している癌組織へターゲティングできる可能性がある。

## 【0008】

一方、タンパク質にシアリルルイス $\times$ 糖鎖が付加した場合は、該タンパク質はセレクチンを発現した細胞（例えば炎症部位の血管内皮細胞）へターゲティングされると考えられる。

従って、任意のタンパク質を肝臓や癌組織へ効率よくターゲティングするためには、タンパク質へ効率よくルイス $\times$ 糖鎖を付加させるとともに、シアリルルイス $\times$ 糖鎖を付加させないことが望ましい。組換え糖タンパク質の生産に適した宿主細胞（例えばNamalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、CHO細胞等）において、任意の組換え糖タンパク質に、シアリルルイス $\times$ 糖鎖を付加させることなく、ルイス $\times$ 糖鎖を効率よく付加させる方法の開発は、産業上重要な課題である。

## 【0009】

これまでに、 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素 (F u c - T I V) を特定のCHO細胞株に発現させると、シアリルルイス $\times$ 糖鎖の発現なしに、ルイス $\times$ 糖鎖が発現することが報告されている [J. Biol. Chem., 266, 17467-17477(1991)、J. Biol. Chem., 266, 21777-21783(1991)]。しかし、F u c - T I Vは本来シアリルルイス $\times$ 糖鎖を合成する活性を有しているために、他の細胞（例えば別のCHO細胞株やNamalwa KJM-1細胞）にF u c - T I Vを発現させた場合には、ルイス $\times$ 糖鎖に加えてシアリルルイス $\times$ 糖鎖が発現する [Cell., 63, 1349-1356、J.

Biol. Chem., 269, 14730-14737(1994)]。

【0010】

導入する細胞により、Fuc-TIVによるシアリルルイスx糖鎖の合成量が異なる原因としては、これら細胞中に存在する基質となる糖鎖の量や質が異なること、および発現させたFuc-TIVや他の糖転移酵素（例えば $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素）の発現量がこれら細胞で異なること等をあげることができる。

【0011】

例えば、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素（ST3Gal IIIあるいはST3Gal IV）とFuc-TIVは同じ基質（N-アセチラクトサミン構造を有する糖鎖）に対して競合すると考えられる。

$\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素の活性がFuc-TIVに比べて相対的に強ければ、優先的に $\alpha 2, 3$ -シアリルN-アセチラクトサミン糖鎖ができ、Fuc-TIVにより該糖鎖にフコースが付加されシアリルルイスx糖鎖が合成されるが、Fuc-TIVの活性が相対的に強ければフコシルN-アセチラクトサミン糖鎖（ルイスx糖鎖）が優先的に合成される。 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素はルイスx糖鎖にシアル酸を付加する活性が弱いため、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素によるシアリルルイスx糖鎖の合成は行われにくい。

【0012】

一方、ルイスx糖鎖を合成する活性は有するが、シアリルルイスx糖鎖を合成する活性を持たない新規な $\alpha 1, 3$ -フコース転移酵素が取得できれば、宿主細胞中でその酵素を発現させることにより、シアリルルイスx糖鎖を合成することなく、ルイスx糖鎖を効率よく合成することが可能と考えられる。物質生産に適した細胞を含む多くの細胞は、ルイスx糖鎖の前駆体であるN-アセチラクトサミン構造を有している。従って、該新規酵素が取得できれば、多くの細胞を宿主として、シアリルルイスx糖鎖を合成することなく、ルイスx糖鎖を効率よく合成することが可能となる。しかしながら、これまでにこのような酵素は知られていない。

【0013】

ルイス x 糖鎖を認識する抗体である抗 CD 15 抗体は、先体反応後のヒト精子と結合し、精子と卵子の相互作用を阻害することから、ルイス x 糖鎖は受精において重要な役割を果たしているとは推定される [American Journal of Reproductive Immunology, 37, 172-183 (1997)]。従って、ヒト精子上のルイス x 糖鎖の生合成に関与している  $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素を同定し、不妊症との関連を調べることは、不妊症の診断や治療に有用であり、ルイス x 糖鎖またはルイス x 糖鎖が付加したタンパク質を用いて、安全で確実な非妊法が確立できる可能性もある。

## 【0014】

従って、この目的においても、任意のタンパク質にルイス x 糖鎖を効率よく付加させる方法の開発は重要な課題である。

白血球の炎症部位への集積やリンパ球のリンパ節へのホーミングには、接着分子セレクトリン (E-、P-、および L-セレクトリン) とその糖鎖リガンド (シアリルルイス x 糖鎖またはその関連糖鎖) の接着が関与していることが明らかとなっている。

## 【0015】

シアリルルイス x 糖鎖およびその構造異性体であるシアリルルイス a 糖鎖は、癌化に伴って発現量が増加する癌関連抗原としても知られており、これらの糖鎖に対する抗体は癌の血清診断に利用されている。

これらの糖鎖がセレクトリンと結合することから、これらの糖鎖は癌の転移にも関与すると考えられている。最近、マウスの腎臓に存在するルイス x 糖鎖を含有する糖脂質が、E-セレクトリンと強く結合することが明らかにされた [Biochem. Biophys. Res. Commun., 218, 610-615 (1996)]。

## 【0016】

セレクトリンに強い結合能を有する糖鎖は、セレクトリンアンタゴニストとして、炎症や癌転移の治療および予防に有用である。従って、マウス腎臓で発現している  $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素は、セレクトリンアンタゴニストの効率的合成に利用可能と推定され、該酵素の同定と生産は重要と考えられるが、これまでに、該酵素は同定されていない。

## 【0017】

これまでに5種類の $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素 (Fuc-TII, Fuc-TIV, Fuc-TV, Fuc-TVI, Fuc-TVII) の遺伝子がクローン化され、それぞれの酵素の受容基質特異性が解析されている [Kukowska-Latalloら: Genes & Dev. 4, 1288-1303 (1990)、Goelzら: Cell 63, 1349-1356 (1990)、Loweら: J. Biol. Chem. 266, 17467-17477 (1991)、Kumarら: J. Biol. Chem. 266, 21777-21783 (1991)、Westonら: J. Biol. Chem. 267, 4152-4160 (1992)、Westonら: J. Biol. Chem. 267, 24575-24584 (1992)、Koszdinら: Biochem. Biophys. Res. Commun. 187, 152-157 (1992)、Sasakiら: J. Biol. Chem. 269, 14730-14737 (1994)、Natsukaら: J. Biol. Chem. 269, 16789-16794 (1994)]。

## 【0018】

Fuc-TIIIは、 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性と $\alpha 1,4$ -フコース転移酵素を有し、シアリルルイスx糖鎖、ルイスx糖鎖、ルイスy糖鎖、シアリルルイスa糖鎖、ルイスa糖鎖 [Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc]、およびルイスb糖鎖 [Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc] を合成可能である (ルイスa糖鎖およびルイスb糖鎖を合成する活性が強い)。

## 【0019】

Fuc-TIVは、シアリルルイスx糖鎖、ルイスx糖鎖、およびルイスy糖鎖を合成可能である (ルイスx糖鎖およびルイスy糖鎖を合成する活性が強い)。

Fuc-TVは、シアリルルイスx糖鎖、ルイスx糖鎖、およびルイスy糖鎖を合成可能である。

Fuc-TVIは、シアリルルイスx糖鎖、ルイスx糖鎖、ルイスy糖鎖を合成可能である。

## 【0020】

Fuc-TVIIは、シアリルルイスx糖鎖のみ合成可能である。

上述のように、クローン化された5種の $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素は、一部重複した受容基質特異性を示すが、厳密にはそれぞれ異なる受容基質特異性を

示す。また、それぞれの酵素は、細胞特異的あるいは時期特異的に発現し、1つの細胞に複数の酵素が同時に発現する場合のあることが明らかとなっている。これらの酵素は、類似の構造を有するフコース含有糖鎖を合成可能であるが、発現する細胞や発現する時期が異なることから、それぞれ別々の機能を担っていると考えられる。

#### 【0021】

細胞や組織の抽出液を酵素源とした酵素学的解析により、該組織や該細胞で発現している $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素を特定することはある程度可能である [Molliconeら : Carbohydrate Research, 228, 265-276 (1992)、Westonら : J. Biol. Chem., 267, 24575-24584 (1992)]。しかし、該酵素学的解析では、複数の $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素を発現している細胞や組織において発現している $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素各々を特定すること、ならびにそれらの $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素各々についての酵素学的特性を明らかにすることはできない。

#### 【0022】

特定の $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素の発現を検出するためには、特異的抗体を用いた免疫的検出法か、遺伝子の塩基配列に基づいた検出法（例えばノーザンハイブリダイゼーション法やPCR法）を用いる必要がある。

#### 【0023】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規な $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性を有するポリペプチドを利用し、抗炎症、抗感染症、または癌転移抑制等の医薬品、乳製品等の食品、タンパク質の改善法、および脳疾患、腎疾患、または癌等の疾患の診断法を提供することを目的とする。

#### 【0024】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明は、以下の(1)～(50)に関する。

(1) 糖鎖の非還元末端に存在するN-アセチルラクトサミン (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) 構造中のN-アセチルグルコサミン(以下、GlcNAcと略す)残基に $\alpha 1,3$ 結合でフコース(以下、Fucと略すこともある)を転移する活性を有し

、かつ糖鎖の非還元末端に存在する $\alpha 2,3$ -シアリルN-アセチルラクトサミン (NeuAc $\alpha 2$ -3Gal $\beta 1$ -4GlcNAc) 構造中のGlcNAc残基に $\alpha 1,3$ 結合でF u cを転移する活性を有しないポリペプチド。

【0025】

(2) 以下の(a)、(b)および(c)から選ばれるポリペプチド。

(a) 配列番号1または2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号1または2記載のアミノ酸配列の56番目から359番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(c) (a)または(b)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、糖鎖の非還元末端に存在するN-アセチルラクトサミン (Gal $\beta 1$ -4GlcNAc) 構造中のGlcNAc残基に $\alpha 1,3$ 結合でF u cを転移する活性を有し、かつ糖鎖の非還元末端に存在する $\alpha 2,3$ -シアリルN-アセチルラクトサミン (NeuAc $\alpha 2$ -3Gal $\beta 1$ -4GlcNAc) 構造中のGlcNAc残基に $\alpha 1,3$ 結合でF u cを転移する活性を有しないポリペプチド。

【0026】

上記のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、出願前周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができ、また、1若しくは数個のアミノ酸とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数のアミノ酸を意味する。

【0027】

かかる1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ新規 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性を有するポリペプチドは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント1~38、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、PCT W085/00817(1985)、Nature, 316, 601 (1985)

等に記載の方法に準じて調製することができる。

【0028】

(3) 糖鎖の非還元末端に存在するGal $\beta$ 1-4GlcNAc構造中のGlcNAc残基に $\alpha$ 1,3結合でFucを転移する活性がルイスx糖鎖 [Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc] およびルイスy糖鎖 [Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc] を合成する活性であり、糖鎖の非還元末端に存在するNeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc構造中のGlcNAc残基に $\alpha$ 1,3結合でFucを転移する活性がシアリルルイスx糖鎖 [NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc] を合成する活性である、上記(1)または(2)記載のポリペプチド。

【0029】

(4) 以下の以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)および(h)から選ばれるDNA。

(a) 請求項1、2および3記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNA。

(b) 配列番号3で表される塩基配列の280から1194番目の塩基配列を有するDNA。

(c) 配列番号3で表される塩基配列の115から1194番目の塩基配列を有するDNA。

(d) 配列番号4で表される塩基配列の1454から2368番目の塩基配列を有するDNA。

(e) 配列番号4で表される塩基配列の1289から2368番目の塩基配列を有するDNA。

(f) 配列番号5で表される塩基配列の460から1374番目の塩基配列を有するDNA。

(g) 配列番号5で表される塩基配列の295から1374番目の塩基配列を有するDNA。

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(f)および(g)のDNAから選ばれるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、糖鎖の非還元末端に存在するN-アセチルラクトサミン (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) 構造

中のN-アセチルグルコサミン残基に $\alpha 1,3$ 結合でフコースを転移する活性を有し、かつ糖鎖の非還元末端に存在する $\alpha 2,3$ -シアリルN-アセチラクトサミン (NeuAc  $\alpha 2$ -3Gal  $\beta 1$ -4GlcNAc) 構造中のN-アセチルグルコサミン残基に $\alpha 1,3$ 結合でフコースを転移する活性を有しないポリペプチドをコードするDNA。

## 【0030】

上記の「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、上 (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) および (g) のDNAから選ばれたDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液 (1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムよりなる) を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

## 【0031】

ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプルメント1~38と略記する)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。

## 【0032】

ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号1または2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を



有するDNA、更に好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0033】

(5) 上記(4)記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

(6) 組換え体DNAが、プラスミドpAM<sub>o</sub>-mFT9またはプラスミドpBS-hFT9(S2)である、上記(5)記載の組換え体DNA。

【0034】

(7) 上記(5)または(6)記載の組換え体DNAを保有する形質転換体。

(8) 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、非ヒトトランスジェニック動物およびトランスジェニック植物から選ばれる形質転換体である、上記(7)記載の形質転換体。

【0035】

(9) 微生物が、Escherichia属に属する微生物である、上記(8)記載の形質転換体。

(10) 動物細胞が、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞およびヒト白血病細胞から選ばれる動物細胞である、上記(8)記載の形質転換体。

【0036】

(11) 昆虫細胞が、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞およびカイコの卵巣細胞から選ばれる昆虫細胞である、上記(8)記載の形質転換体。

(12) 上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体を培養液中で培養し、該ポリペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【0037】

(13) 上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該ポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【0038】

(14) 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、上記(13)記載の製造法。

(15) 上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該ポリペプチドを該植物中に生成蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【0039】

(16) 上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNAを用い、in vitroでの転写・翻訳系により該タンパク質を合成することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

(17) 上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを酵素源として用い、

(a) 該酵素源、

(b) i) N-アセチルラクトサミン (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc)、 ii) N-アセチルラクトサミン構造を非還元末端に有するオリゴ糖、 iii) N-アセチルラクトサミン構造を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質、 iv) それらのN-アセチルラクトサミン構造が硫酸基で修飾された誘導体、およびv) それらのN-アセチルラクトサミン構造が糖で修飾された誘導体であり、かつ該N-アセチルラクトサミン構造中のガラクトース残基に $\alpha$ 2,3結合でシアル酸が付加していない構造を有する誘導体から選ばれる受容基質、および

(c) グアノシン5'-ニリン酸フコース (以下、GDP-Fucと略す)

を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のN-アセチルラクトサミン構造中のGlcNAc残基に $\alpha 1,3$ 結合でFucが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

## 【0040】

(18) 誘導体が、Fuc $\alpha 1-2$ Gal $\beta 1-4$ GlcNAc、Gal $\alpha 1-3$ Gal $\beta 1-4$ GlcNAc、Gal $\alpha 1-3$ (Fuc $\alpha 1-2$ )Gal $\beta 1-4$ GlcNAc、GalNAc $\alpha 1-3$ (Fuc $\alpha 1-2$ )Gal $\beta 1-4$ GlcNAc、Gal $\alpha 1-4$ Gal $\beta 1-4$ GlcNAc、Gal $\beta 1-4$ GlcNAc(6SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)、これらオリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有する糖鎖、および該糖鎖を含有する複合糖質から選ばれる誘導体である、請求項17記載の製造法。

## 【0041】

(19) 上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを酵素源として用い、

(a) 該酵素源、

(b) i)ラクトース (Gal $\beta 1-4$ Glc)、ii)ラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、iii)ラクトース構造を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質、iv)質それらのラクトース構造が硫酸基で修飾された誘導体、およびv)それらのラクトース構造が糖で修飾された誘導体であり、かつ該ラクトース構造中のガラクトース残基に $\alpha 2,3$ 結合でシアル酸が付加していない構造を有する誘導体から選ばれる受容基質、および

(c) GDP-Fuc

を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のラクトースのグルコース残基に $\alpha 1,3$ 結合でFucが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

## 【0042】

(20) 誘導体が、Gal $\alpha 1-3$ Gal $\beta 1-4$ Glc、Gal $\alpha 1-3$ (Fuc $\alpha 1-2$ )Gal $\beta 1-4$ Glc、GalNAc $\alpha 1-3$ (Fuc $\alpha 1-2$ )Gal $\beta 1-4$ Glc、Gal $\alpha 1-4$ Gal $\beta 1-4$ Glc、Gal $\beta 1-4$ Glc(6SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)、これらオリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有

する糖鎖、および該糖鎖を含有する複合糖質から選ばれる誘導体である、請求項19記載の製造法。

## 【0043】

(21) 上記(8)記載の微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞から選ばれる形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中にFucが $\alpha$ 1,3結合でGlcNAc残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該培養物中より該複合糖質を採取することを特徴とする、該複合糖質の製造法。

## 【0044】

(22) 上記(8)記載の非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、Fucが $\alpha$ 1,3結合でGlcNAc残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該動物中より該複合糖質を採取することを特徴とする、該複合糖質の製造法。

## 【0045】

(23) 上記(8)記載のトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、Fucが $\alpha$ 1,3結合でGlcNAc残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該植物中より該複合糖質を採取することを特徴とする、該複合糖質の製造法。

## 【0046】

(24) 複合糖質が、糖蛋白質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リポ多糖、ペプチドグリカン、およびステロイド化合物等に糖鎖が結合した配糖体から選ばれる複合糖質である、上記(17)～(23)のいずれか一つに記載の製造法。

(25) 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、上記(22)記載の製造法。

## 【0047】

(26) 上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNAを用い、ハイブリダイゼーション法により、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

(27) 上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNA、配列番号3で表される塩基配列を有するDNA、配列番号4で表される塩基配列を有するDNAおよび配列番号5で表される塩基配列を有するDNAから選ばれるDNAの有する塩基配列中の連続した10～50塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドの誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれるオリゴヌクレオチド。

## 【0048】

(28) 誘導体オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3' - P5' ホスホアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine)で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2' - O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれる誘導体オリゴヌクレオチドである、上記(27)記載のオリゴヌクレオチド。

## 【0049】

(29) 上記(27)または(28)記載のオリゴヌクレオチドを用い、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション法により、上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

## 【0050】

(30) 上記(26)または(29)記載の方法を用いた、脳疾患、腎疾患または癌の検出法。

(31) 上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNA、配列番号3で表される塩基配列を有するDNA、配列番号4で表される塩基配列を有するDNAおよび配列番号5で表される塩基配列を有するDNAから選ばれるDNAを用い、上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドをコードするDNAの転写を抑制する方法。

【0051】

(32) 上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNA、配列番号3で表される塩基配列を有するDNA、配列番号4で表される塩基配列を有するDNAおよび配列番号5で表される塩基配列を有するDNAから選ばれるDNAを用い、上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドをコードするmRNAの翻訳を抑制する方法。

【0052】

(33) 上記(27)または(28)記載のオリゴヌクレオチドを用い、上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドをコードするDNAの転写を抑制する方法。

(34) 上記(27)または(28)記載のオリゴヌクレオチドを用い、上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドをコードするmRNAの翻訳を抑制する方法。

【0053】

(35) 上記(31)～(34)のいずれか一つに記載の方法を用いた、腎疾患または癌の治療法。

(36) 上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを認識する抗体。

【0054】

(37) 上記(36)記載の抗体を用いる、上記(1)、(2)および(3)

）記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドの免疫学的検出法。

(38) 上記(36)記載の抗体を用い、上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを検出することを特徴とする、免疫組織染色法。

【0055】

(39) 上記(36)記載の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

(40) 上記(36)記載の抗体を含有する、脳疾患、腎疾患または癌の診断薬。

(41) 上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドと被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドの有する活性を変動させる物質のスクリーニング法。

【0056】

(42) 上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、抗ルイスx抗体または抗ルイスy抗体を用い、ルイスx糖鎖含量またはルイスy糖鎖含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

【0057】

(43) 上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、上記(36)記載の抗体を用い、該ポリペプチド含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

【0058】

(44) 上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーターDNA。

(45) プロモーターDNAが、神経細胞、腎細胞、胃上皮細胞、白血球細胞、脳腫瘍細胞、神経芽細胞腫細胞、メラノーマ細胞、腎癌細胞、胃癌細胞、大腸癌細胞、および膀胱癌細胞から選ばれる細胞で機能しているプロモーターである、上記(44)記載のプロモーターDNA。

【0059】

(46) プロモーターDNAが、ヒトまたはマウス由来のプロモーターDNAである、上記(44)または(45)記載のプロモーターDNA。

(47) 上記(44)、(45)および(46)記載のプロモーターDNAから選ばれるプロモーターDNAおよび該プロモーターDNAの下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを用いて動物細胞を形質転換し、該形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法。

【0060】

(48) レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子より選ばれる遺伝子である、上記(47)記載のスクリーニング法。

【0061】

(49) 上記(1)、(2)および(3)記載のポリペプチドから選ばれるポリペプチドをコードするDNAを欠損または変異させたノックアウト非ヒト動物。

(50) ノックアウト非ヒト動物がマウスである、上記(49)記載のノックアウト非ヒト動物。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0062】

【発明の実施の形態】

(1) 新規 $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA(以下、新規 $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素遺伝子と略すこともある)の取得並びに該DNAおよびオリゴヌクレオチドの製造

ルイスx糖鎖またはルイスy糖鎖を発現している細胞より、常法によりcDNAライブラリーを作製する。

【0063】



cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント1～38等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング [SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; ギブコBRL (Gibco BRL) 社製] やザップー cDNA・シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン社製] を用いる方法等があげられる。

## 【0064】

ルイスx糖鎖またはルイスy糖鎖を発現している細胞としては、ルイスx糖鎖またはルイスy糖鎖を発現している細胞であればいかなる細胞でも用いることができ、例えば、マウスやヒトの脳、腎臓、胃、膀胱、精巣等の組織、マウスF9細胞、ヒト神経芽細胞腫細胞株等を用いることができる。

## 【0065】

cDNAライブラリーを作成するための、クローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、 $\lambda$ zap II (ストラタジーン社製)、 $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11 [DNA クローニング、ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning, A Practical Approach), 1, 49 (1985)]、 $\lambda$ Triplex (クローンテック社製)、 $\lambda$ ExCell (ファルマシア社製)、pT7T3 18U (ファルマシア社製)、pcD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)]、pUC18 [ジーン (Gene), 33, 103 (1985)]、pAMo [J.Biol.Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)] 等をあげることができる。

## 【0066】

宿主微生物としては、大腸菌に属する微生物であればいずれでも用いること

ができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]、Escherichia coli SOLR<sup>TM</sup> Strain [ストラタジーン社より市販] および E. coli LE392 (モレキュラー・クローニング第2版) 等が用いられる。

【0067】

cDNAライブラリーとして、例えば以下のようにして作製したcDNAライブラリーをあげることができる。

マウス脳由来のmRNAよりGIBCO BRL社製のcDNA合成システム (cDNA Synthesis System) キットを用いてcDNAを合成する。

【0068】

該DNAの両末端に S f i I リンカーを付与した後、クローニングベクター pAMo の S f i I 部位に挿入したプラスミドを作製する。

該プラスミドを用い、E. coli LE392を形質転換してcDNAライブラリーを作成する。

【0069】

作成したcDNAライブラリーより目的とするDNAを含むクローンを以下の方法で選択する。

上記で作成したcDNAライブラリーから、常法あるいはキアジェン (Qiagen) 社製のプラスミド調製キットである/plasmid/maxi kit (商品番号41031) 等のキットを用いてプラスミドを調製する。

【0070】

pAMoは、動物細胞用の発現ベクターであり、該プラスミドを用いて作製したcDNAライブラリーは、そのまま以後の操作に利用することができる。もし発現ベクター以外のベクターでcDNAライブラリーを作製した時には、

該cDNAライブラリーより挿入cDNAを切り出し、動物細胞あるいは昆虫細胞で発現可能な発現ベクターに組み込み直す必要がある。

#### 【0071】

該発現ベクターとしては、該cDNAを組み込んで発現できるベクターであればいかなるものでも用いることができ、例えば、pcDNA1/Amp、pcDNA1、pCDM8（いずれもフナコシ社より市販）、pAGE107〔特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、pREP4（インビトロジェン社製）、pAGE103〔J. Biochem., 101, 1307 (1987)〕、pAMo、pAMoA〔J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名pAMoPRSA（特開平05-336963）〕、pAS3-3（特開平2-227075）、pVL1392（インビトロジェン社製）、pVL1393（インビトロジェン社製）、pBlueBacIII（インビトロジェン社製）等を用いることができる。

#### 【0072】

cDNAを組み込んだ発現ベクターを、目的とするcDNAを選択可能な動物細胞あるいは昆虫細胞に導入し、形質転換細胞を取得する。

該発現ベクターの導入方法としては、動物細胞あるいは昆虫細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕、およびBaculovirus Expression Vectors, W.H. Freeman and Company, New York (1992)、Molecular Biology, A Laboratory Manual, Current Protocols in Molecular Biology, Bio/Technology, 6, 47 (1988)、Virology, 52, 456 (1973)等に記載の方法をあげることができる。

#### 【0073】

動物細胞としては、ヒトの細胞であるNamalwa細胞、Namalwa細胞のサブラインであるNamalwa KJM-1細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637（特開昭63-299）等をあげることができ、好ましくは、Namalwa細胞またはNamalwa KJM-1細胞をあげることができる。

【0074】

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21〔Baculovirus Expression Vectors (1992)〕、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHigh 5（インビトロジェン社製）等を用いることができる。

得られた形質転換細胞を常法により培養する。

具体的には、以下の形質転換体の培養方法をあげることができる。

【0075】

形質転換体が動物細胞である場合、該細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI 1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、DMEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

【0076】

培養は、通常pH 6～8、30～40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で1～7日間行う。

また培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0077】

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地〔ファーミンジェン (Pharmingen) 社製〕、Sf-900 II SFM培地（ギブコBRL社製）、ExCell 1400、ExCell 1405〔いずれもJRHバイオサイエンス（JRH Biosciences）社製〕、Grace's Insect Medium〔Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。

【0078】

pH 6～7、培養温度25～30℃がよく、培養時間は、通常1～5日間である。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加して

もよい。

【0079】

該培養により得られた細胞を、抗ルイスx糖鎖抗体または抗ルイスy糖鎖抗体を用いて蛍光染色した後、フルオレッセンス・アクティベーター・セル・ソーター (Fluorescence Activated Cell Sorter; 以下、FACSと略記する) を利用して、上記抗体の結合量が増加した細胞を濃縮分離する。

【0080】

ルイスx糖鎖またはルイスy糖鎖に対する抗体としては、ルイスx糖鎖またはルイスy糖鎖と反応する抗体であれば、いかなるものでも用いることができ、例えば、抗ルイスx糖鎖抗体である73-30〔生化学工業社製〕やPM-81、あるいは抗ルイスy糖鎖抗体であるAH-6〔大塚社製〕をあげることができる。また、ポリ-N-アセチラクトサミン糖鎖上のルイスx糖鎖を認識するSSEA-1抗体を使用することもできる。

【0081】

このようにして濃縮分離された細胞から公知の方法、例えば、ハート法 [Mol. Cell. Biol., 8, 2837 (1988)] により、本発明のDNAを含むプラスミドを回収し、該DNAを含むDNA断片を取得することができる。

本発明のDNAを含むプラスミドとしては、例えば、pAMo-mFT9をあげることができる。

【0082】

上記の方法により取得されたDNAの塩基配列は、該DNA断片をそのままあるいは適当な制限酵素等で切断後、モレキュラー・クローニング第2版等に記載の常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] あるいは373A・DNAシーケンサー [パーキン・エルマー (Perkin Elmer) 社製] 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。

【0083】

該方法により取得されるDNAとして、例えば、配列番号1で表されるペプチドをコードするDNA等をあげることができ、具体的には、配列番号3で表される塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

また、上記方法で取得したDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを選択することにより、他の組織あるいは、他の動物由来、例えばヒト由来の目的とするDNAを取得することができる。

#### 【0084】

該DNAとして、例えば、配列番号2で表されるペプチドをコードするDNA等をあげることができ、具体的には、配列番号4あるいは5で表される塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

配列番号5のDNAを含むプラスミドとしては、例えば、pBS-hFT9(S2)をあげることができる。

#### 【0085】

決定されたDNAの塩基配列に基づいて、DNA合成機で化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。DNA合成機としては、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 392等をあげることができる。

#### 【0086】

また、後述のオリゴヌクレオチドをセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用い、これらDNAに相補的なmRNAを発現している細胞のmRNAから調製したcDNAを鋳型として、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (Polymerase Chain Reaction; 以下、PCRと略記する) [モレキュラー・クローニング第2版およびPCR Protocols Academic Press (1990)] 等を行うことによって、目的とするDNAを調製することができる。

#### 【0087】

上述の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用いて、モレキュラー・クローニング第2版等に記載の常法あるいはDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリ

ゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

【0088】

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した10～50塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができ、具体的には、配列番号3、4または5で表される塩基配列中の連続した10～50塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度( $T_m$ ) および塩基数が極端に変わることのない上記記載のオリゴヌクレオチドが好ましい。

【0089】

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

該誘導体オリゴヌクレオチドとしては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5' ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

【0090】

(2) 新規  $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性を有するポリペプチドの製造

上記の方法により得られた本発明のDNAを宿主細胞中で発現させ、本発明のポリペプチドを製造するために、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプルメント1～38等に記載された方法等を用いることができる。

【0091】

即ち、本発明のDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換え体ベクターを造成し、該ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

【0092】

宿主細胞としては、原核細胞、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。また、動物個体や植物個体を用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、新規  $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素遺伝子の転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0093】

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合、新規  $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素遺伝子の発現ベクターは、原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、新規  $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素遺伝子、転写終結配列、より構成されていることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0094】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベーリンガーマンハイム社より市販)、pSE280 (インビトロジェン社製)、pGEMEX-1 (Promega社製)、pQE-8 (QIAGEN社製)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 27



7 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-) (STRATAGENE社)、pTrs30 (FERM BP-5407)、pTrs32 (FERM BP-5408)、pGHA2 (FERM BP-400)、pGKA2 (FERM B-6798)、pTerm2 (特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735)、pKK233-2 (Pharmacia社製)、pGEX (Pharmacia社製)、pETシステム (Novagen社製)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus (Invitrogen社)、pMAL-c2 (New England Biolabs社) 等を例示することができる。

## 【0095】

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (P<sub>trp</sub>)、lacプロモーター (P<sub>lac</sub>)、P<sub>L</sub>プロモーター、P<sub>R</sub>プロモーター、P<sub>SE</sub>プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またP<sub>trp</sub>を2つ直列させたプロモーター (P<sub>trp</sub> x 2)、tacプロモーター、lacT7プロモーター、letIプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

## 【0096】

リボソーム結合配列としては、シャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

## 【0097】

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、

Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

## 【0098】

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)]、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭 63-2483942)、Gene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

## 【0099】

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YE p 13 (ATCC37115)、YE p 24 (ATCC37051)、YC p 50 (ATCC37419)、pHS 19、pHS 15等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF $\alpha$ 1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

## 【0100】

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属等に属する酵母菌株をあ

げることができる、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius 等をあげることができる。

#### 【0101】

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができる。

#### 【0102】

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p cDNA I/Amp、p cDNA I、p CDM8、p AGE107、p REP4、p AGE103、p AMo、p AMoA、p AS3-3等を例示することができる。

#### 【0103】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (ヒトCMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、モロニー・ミュリン・ロイケミア・ウイルス (Moloney Murine Leukemia Virus) のロング・ターミナル・リピート・プロモーター (Long Terminal Repeat Promoter)、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター、あるいはメタロチオネインのプロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

#### 【0104】

宿主細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、ヒトの細胞であるNamalwa細胞ま

たはNamalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HBT5637（特開昭63-299）等をあげることができる。

【0105】

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293、293等、ヒト白血病細胞としては、BALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7等をあげることができる。

【0106】

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等をあげることができる。形質転換体の取得および培養は、特開平2-227075号公報あるいは特開平2-257891号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

【0107】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば、バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、モレキュラー・バイオロジー ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Biology, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サブルメント 1～38 (Current Protocols in Molecular Biology)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

【0108】

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392

、pVL1393、pBlueBacIII（すべてインビトロジェン社製）等をあげることができる。

【0109】

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。

【0110】

Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞としてはSf9、Sf21（バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル）等、Trichoplusia niの卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4（インビトロジェン社製）等、カイコ卵巣由来の培養細胞としてはBombyx mori N4等をあげることができる。

【0111】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

【0112】

また、動物細胞にDNAを導入する方法と同様の方法を用いて、昆虫細胞にDNAを導入することもでき、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる

植物細胞または植物個体を宿主として用いる場合には、公知の方法 [組織培養, 20 (1994)、組織培養, 21 (1995)、Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)] に準じてポリペプチドを生産することができる。

## 【0113】

遺伝子発現に用いるプロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。また、プロモーターと発現させる遺伝子の間に、トウモロコシのアルコール脱水素酵素遺伝子のイントロン1等を挿入することにより、遺伝子の発現効率をあげることもできる。

## 【0114】

宿主細胞としては、ポテト、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、大豆、トマト、小麦、大麦、ライ麦、アルファルファ、亜麻等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*)、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法等をあげることができる。

## 【0115】

遺伝子を導入した植物の細胞や器官は、ジャーファーマンターを用いて大量培養することができる。また、遺伝子導入した植物細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された植物個体 (トランスジェニック植物) を造成することもできる。

## 【0116】

動物個体を用いて本発明のポリペプチドを生産することもできる。例えば、公知の方法 [American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996)、American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S (1996)、Bio/Technology, 9, 830 (1991)] に準じて、遺伝子を導入した動物中に本発明のポリペプチドを生産することができる。

## 【0117】

プロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである $\alpha$ カゼインプロモ

ーター、 $\beta$  カゼインプロモーター、 $\beta$  ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

【0118】

本発明のポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

【0119】

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該ポリペプチドを生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

即ち、動物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該組換え体DNAのコードする新規 $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素活性を有するポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することにより、新規 $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素活性を有するポリペプチドを製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク、卵等をあげることができる。

【0120】

植物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該組換え体DNAのコードする新規 $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素活性を有するポリペプチドを該植物中に生成蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することにより、新規 $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素活性を有するポリペプチドを製造することができる。

【0121】

本発明のポリペプチド製造用形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら生物を培養する培地は、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

## 【0122】

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。

## 【0123】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられる。

## 【0124】

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

## 【0125】

また培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。



## 【0126】

本発明のポリペプチド製造用形質転換体が動物細胞である場合、該細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

## 【0127】

培養は、通常pH6~8、30~40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で1~7日間行う。

また培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

## 【0128】

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 [ファーミンジェン (Pharmingen) 社製]、Sf-900 II SFM培地 (ギブコBRL社製)、ExCel11400、ExCel11405 [いずれもJRHバイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製]、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

## 【0129】

pH6~7、培養温度25~30℃がよく、培養時間は、通常1~5日間である。

また、培養中に必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

## 【0130】

遺伝子の発現方法としては、ポリペプチド全長を発現させる以外に、 $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素活性を有する領域を含む部分ポリペプチドとして発現させることもできる。糖転移酵素は、一般にタイプ2型の膜タンパク質のトポロジーを有し

、N末端の数から数十アミノ酸からなる細胞質領域、疎水性の高いアミノ酸配列を有する膜結合領域、数から数十アミノ酸からなる幹領域 (stem region)、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなっている。幹領域と触媒領域を含む残りの大半のC末端部分は、ゴルジ体内腔に露出していると考えられる。幹領域と触媒領域の境界は、N末端を欠失させたポリペプチドを作製し、どこまで欠失させると活性がなくなるかを検討することにより、実験的に求めることができる。一方、幹領域と触媒領域に関する知見のある類似の糖転移酵素とアミノ酸配列を比較することにより、幹領域と触媒領域を予想することもできる。

#### 【0131】

本発明の新規 $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素の構造も、他の糖転移酵素と同様の構造を有していた。すなわち、新規 $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素は、N末端の10アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く20アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも25アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなると考えられた。他の $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素とのアミノ酸配列上の相同性の比較、ならびに他の $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素の幹領域と触媒領域に関する知見 [J. Biol. Chem., 269, 14730-14737(1994)、J. Biol. Chem., 270, 8712-8722(1995)、Glycobiology, 7, 921-927(1997)] を基に、幹領域は少なくとも25アミノ酸からなると予想された。したがって、56番目から359番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、触媒領域を含むと考えられる。

#### 【0132】

上記のポリペプチド全長または $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素活性を有する領域 (触媒領域) を含む部分ポリペプチドは、直接発現させる以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌タンパク質または融合タンパク質として発現させることもできる。融合させるタンパク質としては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖 (His-tag)、Sペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、Tac抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン

、および任意の抗体のエピトープなどがあげられる〔山川彰夫，実験医学，13，469-474（1995）〕。

#### 【0133】

本発明のポリペプチドの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

#### 【0134】

本発明のポリペプチドが宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法〔J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)〕、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、または特開平05-336963、特開平06-823021等に記載の方法を準用することにより、該ポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

#### 【0135】

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明のポリペプチドの活性部位を含むポリペプチドの手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

#### 【0136】

具体的には、触媒部位を含むと考えられる56番目から359番目までのアミノ酸配列を有するポリペプチドの手前に、シグナルペプチドを付加して発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができると考えられる。さらに、シグナルペプチドと触媒領域を含むポリペプチドの間、または触媒領域を含むポリペプチドのC末端に、精製・検出用のタグを付加することもできる。精製・検出用のタグとしては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、ポリ(Glu)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖

(His-tag)、Sペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、Tac抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、および任意の抗体のエピトープなどがあげられる〔山川彰夫，実験医学，13，469-474（1995）〕。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

#### 【0137】

本発明ポリペプチド製造用形質転換体の培養物から、本発明のポリペプチドを単離・精製するには、通常の酵素の単離・精製法を用いることができる。

例えば、本発明のポリペプチドが本発明のポリペプチド製造用形質転換体の細胞内に溶解状態で蓄積する場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、該細胞を洗浄した後に、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。

#### 【0138】

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）セファロース、DIAION HPA-75（三菱化成社製）等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（ファルマシア社製）等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用い、精製標品を得ることができる。

#### 【0139】

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体をポリペプチド変性剤で可溶化する。該可溶化液を、ポリペプチド変性剤を含まないあるい

はポリペプチド変性剤の濃度がポリペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

【0140】

細胞外に該ポリペプチドが分泌される場合には、該培養物を遠心分離等の手法により処理し、可溶性画分を取得する。該可溶性画分から、上記無細胞抽出液上清からの単離精製法と同様の手法により、該ポリペプチドの精製標品を得ることができる。

【0141】

また、通常の糖転移酵素の精製方法 [J. Evan. Sadler ら: メソッド・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 83, 458] に準じて精製できる。

また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる [山川彰夫, 実験医学, 13, 469-474 (1995)]。例えば、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、特開平05-336963、特開平06-823021に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。また、本発明のポリペプチドをFLAGペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗FLAG抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]。更に、該ポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

【0142】

また、公知の方法 [J. Biomolecular NMR, 6, 129-134、Science, 242, 1162-1164、J. Biochem., 110, 166-168 (1991)] に準じて、in vitro転写・翻訳系を用いて本発明の $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素を生産することができる。

更に、本発明のポリペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（tert-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンスド・ケムテック（Advanced ChemTech）社、パーキン・エルマー社、ファルマシアバイオテック社、プロテイン・テクノロジー・インストゥルメント（Protein Technology Instrument）社、シンセセル・ベガ（Synthecell-Vega）社、パーセプティブ（PerSeptive）社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

## 【0143】

精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、蛋白質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析（平野久著、東京化学同人発行、1993年）に記載の方法により実施可能である。

本発明の新規 $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素活性を有するポリペプチドの $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素活性は、公知の測定法 [Methods in Enzymology, 83, 458, Methods in Enzymology, 179, 397, J. Biol. Chem., 269, 14730-14737 (1994)、特開平06-823021] に準じて測定することができる。

## 【0144】

(3) Fucが $\alpha$ 1,3結合でGlcNAc残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造

上記(2)で取得した微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞由来の形質転換体から選ばれる形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中にFucが $\alpha$ 1,3結合でGlcNAc残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または複合糖質を採取することにより、該糖鎖または複合糖質を製造することができる。

## 【0145】

Fucが $\alpha$ 1,3結合でGlcNAc残基に付加した構造を有する糖鎖として、ルイスx構造を含有する糖鎖、ルイスy構造を含有する糖鎖等をあげることができる。

培養は上記（２）に準じて行うことができる。

【0146】

上記形質転換体において、本発明のポリペプチドと任意の組換え糖タンパク質（例えば医薬用組換え糖タンパク質）を、糖鎖合成可能な形質転換体中で同時に生産させることにより、該組換え糖タンパク質に F u c が  $\alpha 1,3$  結合で GlcNAc 残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖を付加することができる。

【0147】

また、上記（２）で取得した動物個体または植物個体を用い、上記（２）の方法に準じて、F u c が  $\alpha 1,3$  結合で GlcNAc 残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

【0148】

即ち、動物個体の場合、例えば、本発明の DNA を保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、F u c が  $\alpha 1,3$  結合で GlcNAc 残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を生成・蓄積させ、該動物中より該生成物を採取することにより、F u c が  $\alpha 1,3$  結合で GlcNAc 残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

【0149】

該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク、卵等をあげることができる。

植物個体の場合、例えば、本発明の DNA を保有するトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、F u c が  $\alpha 1,3$  結合で GlcNAc 残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を生成・蓄積させ、該植物中より該生産物を採取することにより、F u c が  $\alpha 1,3$  結合で GlcNAc 残基またはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

【0150】

上記(2)記載の方法で取得される本発明のポリペプチドを酵素源として用い、水性媒体中でN-アセチルラクトサミン構造中のGlcNAc残基に $\alpha 1,3$ 結合でFucが付与された反応産物を、以下の方法で製造することができる。

#### 【0151】

即ち、N-アセチルラクトサミン (Gal  $\beta$  1-4GlcNAc)、N-アセチルラクトサミン構造を非還元末端に有するオリゴ糖、N-アセチルラクトサミン構造を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質、それらのN-アセチルラクトサミン構造が硫酸基で修飾された誘導体、それらのN-アセチルラクトサミン構造が糖で修飾された誘導体でありかつ該N-アセチルラクトサミン構造のガラクトース残基に $\alpha 2,3$ 結合でシアル酸が付加していない構造を有する誘導体等を受容基質として、上記(2)記載の方法で取得される本発明のポリペプチドを酵素源として用い、該受容基質、該酵素源およびGDP-Fucを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のN-アセチルラクトサミン構造中のGlcNAc残基に $\alpha 1,3$ 結合でFucが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することにより、該反応産物を製造することができる。

#### 【0152】

酵素源は、ラクト-N-ネオテトラオース (Lacto-N-neotetraose, Gal  $\beta$  1-4GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Glc) を基質として、37℃で1分間に1 $\mu$ モルのラクト-N-フコペンタオースIII [Lacto-N-fucopentaose III, Gal  $\beta$  1-4(Fuc  $\alpha$  1-3)GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Glc] を生成することのできる活性を1単位 (U) として、0.1mU/1~10,000U/1であり、好ましくは1mU/1~1,000U/1の濃度で用いる。

#### 【0153】

水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類などをあげることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。また、上記(2)記載の培養により得られた形質転換体の培養液、上記(2)記載の非ヒトトランスジェニック動物より得ら



れたミルクを水性媒体として用いることもできる。

#### 【0154】

水性媒体に、必要に応じて界面活性剤あるいは有機溶媒を添加してもよい。界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン（例えばナイミンS-215、日本油脂社製）などの非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド（例えばカチオンF2-40E、日本油脂社製）などのカチオン系界面活性剤、ラウロイル・ザルコシネートなどのアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン（例えば三級アミンFB、日本油脂社製）などの三級アミン類など、Fuc含有糖質の生成を促進するものであればいずれでもよく、1種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常0.1～50g/lの濃度で用いられる。

#### 【0155】

有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチルなどが挙げられ、通常0.1～50ml/lの濃度で用いられる。

UDP-Fucとしては、市販品の他、微生物等の活性を利用して生成した反応液あるいは該反応液から精製したものをを用いることができる。

#### 【0156】

該UDP-Fucは0.1～500mMの濃度で用いることができる。

上記において、N-アセチルラクトサミン構造が硫酸基で修飾された誘導体あるいはN-アセチルラクトサミン構造が糖で修飾された誘導体であり、かつ該N-アセチルラクトサミン構造のガラクトース残基に $\alpha 2,3$ 結合でシアル酸が付加していない構造を有する誘導体として、 $\text{Fuc} \alpha 1-2\text{Gal} \beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal} \alpha 1-3\text{Gal} \beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal} \alpha 1-3(\text{Fuc} \alpha 1-2)\text{Gal} \beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{GalNAc} \alpha 1-3(\text{Fuc} \alpha 1-2)\text{Gal} \beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal} \alpha 1-4\text{Gal} \beta 1-4\text{GlcNAc}$ 、 $\text{Gal} \beta 1-4\text{GlcNAc}(6\text{SO}_3^-)$ 、これらオリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有する糖鎖、該糖鎖を含有する複合糖質等をあげることができる。

#### 【0157】

受容基質は0.01～500mMの濃度で用いることができる。

該生成反応において、必要に応じて $MnCl_2$ 等の無機塩、 $\beta$ -メルカプトエタノール、ポリエチレングリコール等を添加することができる。

生成反応は水性媒体中、 $pH 5 \sim 10$ 、好ましくは $pH 6 \sim 8$ 、 $20 \sim 50^\circ C$ の条件で1～96時間行う。

#### 【0158】

また、上記(2)記載の方法で取得される本発明のポリペプチドを酵素源として用い、水性媒体中でラクトース構造中のグルコース残基に $\alpha 1,3$ 結合でFucが付与された反応産物を、以下の方法で製造することができる。

#### 【0159】

即ち、ラクトース( $Gal\beta 1-4Glc$ )、ラクトース構造を非還元末端に有するオリゴ糖、ラクトース構造を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質、それらのラクトース構造が硫酸基で修飾された誘導体、それらのラクトース構造が糖で修飾された誘導体でありかつ該ラクトース構造のガラクトース残基に $\alpha 2,3$ 結合でシアル酸が付加していない構造を有する誘導体等を受容基質として、上記(2)記載の方法で取得される本発明のポリペプチドを酵素源として用い、該受容基質、該酵素源および $GDP-Fuc$ を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のラクトース構造中のグルコース残基に $\alpha 1,3$ 結合でFucが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することにより、該反応産物を製造することができる。

#### 【0160】

上記においてラクトース構造が硫酸基で修飾された誘導体あるいはラクトース構造が糖で修飾された誘導体でありかつ該ラクトース構造のガラクトース残基に $\alpha 2,3$ 結合でシアル酸が付加していない構造を有する誘導体として、 $Gal\alpha 1-3Gal\beta 1-4Glc$ 、 $Gal\alpha 1-3(Fuc\alpha 1-2)Gal\beta 1-4Glc$ 、 $GalNAc\alpha 1-3(Fuc\alpha 1-2)Gal\beta 1-4Glc$ 、 $Gal\alpha 1-4Gal\beta 1-4Glc$ 、 $Gal\beta 1-4Glc(6SO_3^-)$ 、これらオリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有する糖鎖、該糖鎖を含有する複合糖質等をあげることができる。

#### 【0161】

生成反応は、受容基質の種類を変える以外、上記受容基質のN-アセチルラク

トサミン構造中のGlcNAc残基に $\alpha 1,3$ 結合でFucが付与された反応産物を生成させる反応条件と同じ条件で行うことができる。

上記方法により生産される糖鎖または複合糖質より、公知の酵素的手法または化学的手法により糖鎖の一部を切り出すことができる〔日本生化学会編、続生化学実験講座、第4巻、複合糖質研究法Ⅰ,Ⅱ,東京化学同人、(1986年)、谷口直之・鈴木明身・古川清・菅原和幸 監修、グリコバイオロジー実験プロトコール、秀潤社、(1996年)〕。

#### 【0162】

(4) 本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドを用いた疾患の治療や診断等への利用

本発明のDNAは、アンチセンスRNA/DNA技術〔バイオサイエンスとインダストリー、50, 322 (1992)、化学、46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学、16, 1463 (1997)〕あるいはトリプル・ヘリックス技術〔Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)〕を用いた脳疾患、腎疾患、または癌等の疾病の治療、ノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法を用いたそれら疾病の診断に利用することが可能である。

#### 【0163】

例えば、上記(1)記載の本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を投与することにより、本発明のポリペプチドの生産を抑制することができる。

即ち、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を用いて、本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写の抑制、本発明のポリペプチドをコードするmRNAの翻訳の抑制を行うことが可能である。

#### 【0164】

また、本発明のDNAあるいは該DNAより調製した上記オリゴヌクレオチドを用い、ノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法により、本発明のポリペプチドをコードするDNAの発現量を定量することができる。

更に、本発明のDNAをプローブとして、公知の方法〔東京大学医科学研究

所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコール、秀潤社（1993年）]  
を用いて、該遺伝子のプロモーター領域を取得することが可能である。

【0165】

プロモーター領域としては、哺乳動物細胞において本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写に関与するすべてのプロモーター領域があげられる。例えば、ヒトの神経細胞、腎臓細胞、胃上皮細胞、白血球細胞、脳腫瘍細胞、神経芽細胞腫細胞、メラノーマ細胞、腎臓癌細胞、胃癌細胞、大腸癌細胞、または脾臓癌細胞で、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写に関与するプロモーター領域をあげることができる。該プロモーターは後述のスクリーニング法に利用することができる。

【0166】

(5) 本発明のポリペプチドを認識する抗体の生産

(i) ポリクローナル抗体の作製

上述(2)の方法により取得したポリペプチドの全長または部分断片精製標品、あるいは本発明の蛋白質の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

【0167】

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、3～20週令のラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

該抗原の投与量は動物1匹当たり50～100 $\mu$ gが好ましい。

ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン (keyhole limpet haemocyanin) や牛チログロブリンなどのキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

【0168】

該抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに3～10回行う。各投与後、3～7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法 (ELISA法) : 医学書院刊

1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] 等で確認する。

【0169】

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿 [Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)]、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

【0170】

(i i) モノクローナル抗体の作製

(a) 抗体産性細胞の調製

免疫に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

【0171】

該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。

該脾臓をMEM培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、1, 200 rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

【0172】

得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液（pH 7. 65）で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

(b) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。

## 【0173】

たとえば、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) 骨髓腫細胞株P3-X63Ag 8-U1(以下、P3-U1と略す) [Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Europ. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975)] 等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地 [RPMI-1640培地にグルタミン (1.5 mM)、2-メルカプトエタノール ( $5 \times 10^{-5}$  M)、ジェンタマイシン ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) および牛胎児血清 (FCS) (CSL社製、10%) を加えた培地 (以下、正常培地という) に、さらに8-アザグアニン ( $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加えた培地] で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を  $2 \times 10^7$  個以上用いる。

## 【0174】

## (c) ハイブリドーマの作製

(a) で取得した抗体産生細胞と (b) で取得した骨髓腫細胞をMEM培地またはPBS (リン酸二ナトリウム 1.83 g、リン酸一カリウム 0.21 g、食塩 7.65 g、蒸留水 1リットル、pH 7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髓腫細胞 = 5~10 : 1 になるよう混合し、1,200 rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

## 【0175】

得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、 $10^8$ 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) 2 g、MEM 2 ml およびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7 ml を混合した溶液を0.2~1 ml 添加し、更に1~2分間毎にMEM培地1~2 ml を数回添加する。

## 【0176】

添加後、MEM培地を加えて全量が50 ml になるように調製する。

該調製液を900 rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸

込み、吹出しでゆるやかに HAT 培地〔正常培地にヒポキサンチン ( $10^{-4}\text{M}$ )、チミジン ( $1.5 \times 10^{-5}\text{M}$ ) およびアミノプテリン ( $4 \times 10^{-7}\text{M}$ ) を加えた培地〕100 ml 中に懸濁する。

## 【0177】

該懸濁液を 96 穴培養用プレートに  $100 \mu\text{l}$  / 穴ずつ分注し、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター中、 $37^\circ\text{C}$  で 7~14 日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとりアンチボディイズ [Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)] 等に述べられている 酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

## 【0178】

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の (d) で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットまたは抗マウス IgG グロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のポリペプチドモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

## 【0179】

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを 2 回繰り返す〔1 回目は、HT 培地 (HAT 培地からアミノプテリンを除いた培地)、2 回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のポリペプチドの抗ポリペプチド抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

## 【0180】

## (d) モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristan) 0.5 ml を腹腔内投与し、2 週間飼育する〕した 8~10 週令のマウスまたはヌードマウスに、(c) で取得した本発明のポリペプチドモノク

ローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞  $5 \sim 20 \times 10^6$  細胞/匹を腹腔内に注射する。10～21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

【0181】

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清より、ポリクローナルで用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

【0182】

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。蛋白質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

(6) 本発明の抗体の利用

(a) 本発明の抗体を用いて、本発明のポリペプチドを検出することができる。

【0183】

具体的にはマイクロタイタープレートを用いるELISA法・蛍光抗体法、ウェスタンブロット法等を用いた検出法をあげることができる。

(b) 本発明の抗体を用いて、本発明のポリペプチドを発現する細胞の免疫組織染色に利用できる。

【0184】

(c) 本発明の抗体を用いて、脳疾患、腎疾患または癌等の疾病の診断に利用することができる。

(7) スクリーニング法への応用。

本発明のポリペプチドは、新規 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性を有することから、該ポリペプチドの活性を増強または阻害する化合物を用いて、細胞におけるルイス $\times$ 糖鎖、ルイス $\gamma$ 糖鎖、またはそれらの修飾糖鎖の合成量を増加または低下させることが可能である。

【0185】

また、該ポリペプチドをコードする遺伝子の転写過程、あるいは転写産物か



らタンパク質への翻訳過程を促進または抑制する化合物は、該ポリペプチドの発現を制御し、細胞におけるルイスx糖鎖、ルイスy糖鎖、またはそれらの修飾糖鎖の合成量を制御することが可能である。

【0186】

上記化合物は、脳疾患、腎疾患、または癌等の疾病の治療や、ルイスx糖鎖、ルイスy糖鎖、またはそれらの修飾糖鎖の合成に有用と考えられる。

該化合物は、以下(a)～(e)に示す方法により取得可能である。

(a) 上記(2)で記載した方法を用いて調製した本発明の新規 $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素活性を有するポリペプチド(精製物あるいは該ポリペプチドを発現する形質転換体の細胞抽出液または培養上清)を酵素として用い、被験試料の存在下、公知の方法[Methods in Enzymology, 83,458, Methods in Enzymology, 179,397, J.Biol.Chem., 269, 14730-14737 (1994)、特開平06-823021]を用いて $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素活性を測定し、 $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素活性を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

【0187】

(b) 本発明のポリペプチドを発現する細胞または上記(2)で記載した形質転換体を、被験試料の存在下、上記(2)で記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞表面のルイスx糖鎖、ルイスy糖鎖、またはそれらの修飾糖鎖の量をそれぞれの糖鎖に対する抗体を用いて測定し、該糖鎖量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

【0188】

上記抗体を用いた測定法としては、例えば、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色等を用いた検出法をあげることができる。

(c) 本発明のポリペプチドを発現する細胞を、被験試料の存在下、上記(2)で記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該ポリペプチド量を、上記(5)で記載した本発明の抗体を用いて測定し、該ポリペプチド量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

【0189】

本発明の抗体を用いた測定法としては、例えば、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色等を用いた検出法をあげることができる。

(d) 本発明のポリペプチドを発現する細胞を、被験試料の存在下、上記(2)で記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該ポリペプチドをコードする遺伝子転写産物の量を、上記(4)で記載したノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法等の方法を用いて測定し、該転写産物量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

#### 【0190】

(e) 上記(4)で取得したプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAを組み込んだプラスミドを公知の方法により作製し、上記(2)記載の動物細胞に、上記(2)記載の方法に準じて導入し、形質転換体を取得する。該形質転換体を、被験試料の存在下、上記(2)記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中のレポーター遺伝子の発現量を、公知の方法〔東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコール、秀潤社(1993)、Biotechniques, 20, 914 (1996)、J. Antibiotics, 49, 453 (1996)、Trends in Biochemical Sciences, 20, 448 (1995)、細胞工学, 16, 581 (1997)〕を用いて測定し、該発現量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

#### 【0191】

レポーター遺伝子としては、例えば、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン・フルオレッセント・プロテイン(GFP)遺伝子等をあげることができる。

#### 【0192】

##### (7) ノックアウト動物の作製

本発明のDNAを含むベクターを用い、目的とする動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ニワトリ、マウス等の胚性幹細胞(embryonic stem cell)において染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAを公知の相

同組換えの手法〔例えば、Nature, 326, 6110, 295 (1987)、Cell, 51, 3, 503 (1987)等〕により不活化または任意の配列と置換した変異クローンを作成することができる〔例えば、Nature, 350, 6315, 243 (1991)〕。

## 【0193】

このようにして作成した胚性幹細胞クローンを用い、動物の受精卵の胚盤胞(blastocyst)への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を作成することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞の染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAに任意の変異を有する個体を得ることができ、さらにその個体の掛け合わせにより相同染色体の双方に変異が入った、ホモ個体(ノックアウト動物)を得ることができる。

## 【0194】

このようにして動物個体において、染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの任意の位置へ変異の導入が可能である。例えば染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの翻訳領域中への塩基置換、欠失、挿入等の変異を導入することにより、その産物の活性を変化させることができる。またその発現制御領域への同様な変異の導入により、発現の程度、時期、組織特異性等を改変させることも可能である。さらにCre-loxP系との組合せにより、より積極的に発現時期、発現部位、発現量等を制御することも可能である。このような例としては脳のある特定の領域で発現されるプロモータを利用して、その領域でのみ目的遺伝子を欠失させた例〔Cell, 87, 7, 1317 (1996)〕やCreを発現するアデノウィルスを用いて、目的の時期に、臓器特異的に目的遺伝子を欠失させた例〔Science, 278, 5335, (1997)〕が知られている。

## 【0195】

従って染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAについてもこのように任意の時期や組織で発現を制御できる、または任意の挿入、欠失、置換をその翻訳領域や、発現制御領域に有する動物個体を作成することが可能である。

このような動物は任意の時期、任意の程度または任意の部位で、本発明のポ

リペプチドに起因する種々の疾患の症状を誘導することができる。

従って、本発明のノックアウト動物は、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患の治療や予防において極めて有用な動物モデルとなる。特にその治療薬、予防薬、また機能性食品、健康食品等の評価用モデルとして非常に有用である。

【0196】

【実施例】

以下実施例を示す。遺伝子操作的手法として、特に断らない限りモレキュラー・クローニング第2版に記載された公知の方法を用いた。

【0197】

実施例1 新規マウス $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素遺伝子(cDNA)のクローニング

(1) マウス脳からのmRNAの取得

BALB/cマウスの脳より、ロッシュ(Roche)社製のmRNA抽出キットであるOligotex<sup>TM</sup>-dT30<super>を用いて、約30 $\mu$ gのmRNAを取得した。具体的試薬および方法は、キットに添付されている説明書に従った。

【0198】

(2) マウス脳cDNAのライブラリーの作製

上記(1)で取得したマウス脳由来のmRNA 8 $\mu$ g、およびGIBCO BRL社製のキット(SUPERSCRIPT Choice System for cDNA Synthesis)を用い、オリゴdTをプライマーとして2本鎖cDNAを合成した。

【0199】

これら二本鎖cDNAの両末端に以下の方法でSfiIリンカーを付与した。  
〔SfiIリンカーの付与〕

配列番号6で示された一本鎖DNAおよび配列番号7で示された一本鎖DNAをアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。

【0200】

該合成一本鎖DNAをそれぞれ50 $\mu$ gずつ、別々に50mM トリス-HCl (pH7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、5mM ジチオスレイトール(

以下、DTTと略記する)、0.1 mM EDTAおよび1 mM ATPを含む緩衝液(以下、T4キナーゼ緩衝液と略記する)50  $\mu$ lに溶解し、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製)30単位を加えて、37℃で16時間リン酸化反応を行ない、11塩基および8塩基のリンカーを取得した。

## 【0201】

11塩基のリンカー 4  $\mu$ g、8塩基のリンカー 2.9  $\mu$ gおよび上記で合成した2本鎖cDNAをT4リガーゼ緩衝液45  $\mu$ lに溶解後、T4 DNAリガーゼ1050単位を加え、16℃で16時間反応させ、該二本鎖DNA各々にSfiIリンカーを付与した。

## 【0202】

得られた反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、約1.5 kb以上のDNA断片を回収した。

直接発現クローニングベクター(Expression Cloning Vector)であるpAMo [J.Biol.Chem., 268, 22782(1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)] 24  $\mu$ gを、10 mM トリス-HCl (pH 7.5)、6 mM MgCl<sub>2</sub>、50 mM NaCl、6 mM 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液(以下、Y-50緩衝液と略記する)590  $\mu$ lに溶解後、80単位のSfiI(宝酒造社製、以下、特に断らないかぎり制限酵素は宝酒造社製のものを用いた)を加え、37℃で16時間消化反応を行なった。

## 【0203】

該反応液に40単位のBamHIを加え、37℃で2時間消化反応を行なった。

該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、約8.8 kbのDNA断片を回収した。

上記で調製したSfiIリンカーを付与したDNA(mRNA 8  $\mu$ g由来分)をT4リガーゼ緩衝液250  $\mu$ lに溶解後、該溶解液に、該約8.8 kbのDNA断片2  $\mu$ gおよびT4 DNAリガーゼ2000単位を加えて、16℃で16時間結合反応を行なった。

## 【0204】

反応後、該反応液にトランスファーRNA (tRNA) 5  $\mu$ gを添加し、エタノール沈殿後、10 mM トリス-HCl (pH 8.0) および1 mM EDTA (エチレンジアミン4酢酸ナトリウム) からなる緩衝液 (以下、TE緩衝液と略記する) 20  $\mu$ lに溶解した。

【0205】

該反応液を用い、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127(1988)] により大腸菌LE392株 [モレキュラー・クローニング第2版] を形質転換し、約100万個のアンピシリン耐性を有する形質転換体を取得し、cDNAライブラリーを構築した。

【0206】

(3) 形質転換細胞に抗イスx糖鎖抗体 (PM-81) との反応性を増加させる遺伝子 (cDNA) のクローン化

上記(2)で構築したcDNAライブラリー (大腸菌) から、キアジェン (Qiagen) 社製のプラスミド調製キットである/plasmid/maxi kit (商品番号 41031) を用いてプラスミドを調製した。

【0207】

該プラスミドをエタノール沈殿後、1  $\mu$ g/ $\mu$ lになるようにTE緩衝液に溶解した。

該プラスミド (40  $\mu$ g) を、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により、Namalwa細胞に導入した。

1.  $6 \times 10^6$ 細胞あたり4  $\mu$ gのプラスミドを導入した後、8 mlのRPMI 1640培地 [7.5% NaHCO<sub>3</sub>を1/40量、200 mM L-グルタミン溶液 (GIBCO 社製) を3%、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (GIBCO 社製、5000 units/ml ペニシリン、5000  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン) を0.5%添加したRPMI 1640培地 (日水製薬社製)] に懸濁し、CO<sub>2</sub>インキュベーターで37℃で24時間培養した。

【0208】

培養後、G418 (ギブコ社製) を0.5 mg/mlになるように添加し、更に10日間培養し安定形質転換株を取得した。

該形質転換株を、0.5 mg/ml の G418 を含む RPMI 1640 で培養後、得られた約  $4 \times 10^7$  個の細胞を、ルイス x 糖鎖に対する抗体である PM-81 を用いた間接蛍光抗体染色に供した。

## 【0209】

具体的方法を以下に示す。

約  $4 \times 10^7$  の安定形質転換細胞を 50 ml の遠心チューブ (2059 チューブ: ファルコン社製) に取り、遠心分離 ( $130 \times g$ 、10 分間) により細胞を集めた。

## 【0210】

該細胞を、0.1% のアジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝液 PBS (A-PBS: 8 g/l NaCl、0.2 g/l KCl、1.15 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (無水)、0.2 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.1% アジ化ナトリウム) 20 ml を用いて洗浄した。

## 【0211】

該洗浄細胞に、A-PBS で約  $10 \mu\text{g/ml}$  に希釈した抗ルイス x 糖鎖抗体 (PM-81) を 0.5 ml 加えて懸濁し、 $4^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた。

反応後、該細胞を A-PBS 20 ml で 1 回洗浄した後、該細胞に、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) で蛍光標識した抗マウス IgM 抗体 (CAPPEL 社製) を A-PBS で 16 倍希釈した溶液を  $300 \mu\text{l}$  加えて懸濁し、 $4^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させた。

## 【0212】

反応後、該細胞を A-PBS で 1 回洗浄した後、A-PBS 1 ml に懸濁し、フルオレッセンス・アクティベティド・セル・ソーター [エピックス・エリート・フローサイトメーター (EPICS Elite Flow Cytometer) ; コールター (COULTER) 社製] を用いて、蛍光強度の高い細胞 (上位 2.0%) を無菌的に分離回収した。

## 【0213】

回収した細胞を、0.5 mg/ml の G418 を含む RPMI 1640 培地を用い培養し、増殖させた後、上記と同様の操作により蛍光強度の高い細胞を

無菌的に分離回収した。

該操作を再度繰り返し、蛍光強度の高い細胞を分離濃縮した。

2回目の操作では蛍光強度の高い細胞（上位1.5%）を、3回目の操作では蛍光強度の高い細胞（上位1.5%）を、4回目の操作では蛍光強度の高い細胞（上位1.0%）を分離回収した。

【0214】

該分離操作により、蛍光強度の増加した細胞、すなわちルイスx糖鎖の発現量の増加した細胞を取得した。

該細胞を0.5mg/mlのG418を含むRPMI1640培地で培養後、約 $2 \times 10^6$ 個の細胞からハート法 [Mol. Cell. Biol., 8, 2837(1988)] によりプラスミドを回収した。

【0215】

該プラスミドを、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127(1988)] により大腸菌LE397株に導入し、アンピシリン耐性を有する形質転換体を取得した。

該形質転換体40個よりプラスミドを調製し、それぞれのプラスミドを、制限酵素（HindIIIとAsp718）で切断して挿入されたcDNAの構造を調べた。

【0216】

該プラスミドをフェノールクロロホルム抽出した後、エタノール沈澱を行い、該プラスミドを回収した。

該プラスミドをTE緩衝液10 $\mu$ lに溶解し、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133(1990)] によりそれぞれのプラスミドをNamalwa細胞に導入した。

【0217】

即ち、 $1.0 \sim 1.6 \times 10^6$ 個の細胞（200 $\mu$ l）に対し、上記で調製したプラスミド3 $\mu$ lまたはpAM $\phi$ （コントロールプラスミド）4 $\mu$ gをそれぞれエレクトロポレーション法で導入した後、8mlのRPMI1640培地に懸濁し、CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で24時間培養した。



## 【0218】

培養後、G418 (GIBCO BRL社製) を0.5 mg/mlになるように添加して、さらに10～14日培養し、形質転換細胞を取得した。

得られた形質転換細胞について、抗ルイスx糖鎖抗体 (PM-81) を用いた間接蛍光抗体染色を行なったところ、pAMo-mFT9と命名したプラスミドを導入した細胞においては、pAMoを導入した細胞に比較して、抗ルイスx糖鎖抗体 (PM-81) への反応性 (ヒストグラムのピーク値) が約20倍に増加していた。

## 【0219】

以上の結果より、プラスミドpAMo-mFT9中に挿入されているcDNAにより、形質転換細胞の抗ルイスx糖鎖抗体 (PM-81) への反応性が増加することが明らかとなった。

抗ルイスx糖鎖抗体 (PM-81) を用いた間接蛍光抗体染色は以下のようにして行なった。

## 【0220】

約 $1 \times 10^6$ 個の形質転換細胞をマイクロチューブ (1.5 ml: エッペンドルフ社製) にとり、遠心分離 ( $550 \times g$ , 7分間) により細胞を集めた。

該細胞を0.9 mlのA-PBSで洗浄した後、該洗浄細胞にA-PBSで約 $10 \mu g/ml$ に希釈した抗ルイスx糖鎖抗体 (PM-81) を $20 \mu l$ 加えて懸濁し、 $4^\circ C$ で1時間反応させた。

## 【0221】

反応後、細胞を0.9 mlのA-PBSで1回洗浄した後、FITCで蛍光標識した抗マウスIgM抗体 (CAPPEL社製) をA-PBSで16倍希釈した溶液を $20 \mu l$ 加えて懸濁し、 $4^\circ C$ で30分間反応させた。

反応後、細胞を0.9 mlのA-PBSで1回洗浄した後、0.6 mlのA-PBSに懸濁し、フルオレッセンス・アクティベーター・セル・ソーターを用いて解析を行なった。また対照実験として、抗ルイスx糖鎖抗体 (PM-81) の代わりにA-PBSを用いて同様の解析を行なった。

## 【0222】

(4) プラスミド pAMo-mFT9 中に挿入されている cDNA の塩基配列の決定

上記(3)で得られたプラスミド pAMo-mFT9 が含む cDNA の制限酵素地図を作成後、該 cDNA 由来の DNA 断片を pBluescript II SK(-) にサブクローニングし、該 cDNA の全塩基配列を決定した。塩基配列は、パーキンエルマー社の DNA シークエンサー 377 を用いて決定した。塩基配列の決定は、パーキンエルマー社のキットを使用し、キットの指示に従って行った。その結果をつなぎ合わせるにより、プラスミド pAMo-mFT9 が含む cDNA の全塩基配列 (2170 bp) を決定した。

【0223】

該 cDNA の塩基配列を配列番号 3 に示した。

該 cDNA は、糖転移酵素に特徴的な構造を有する 359 アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。該ポリペプチドはこれまでにクローン化された 5 種のヒト  $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素とアミノ酸レベルで 35%~38% の相同性を示したことから、新規な  $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素であると考えられた。該ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号 1 に示した。

【0224】

該ポリペプチドは、N 末端の 10 アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く 20 アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも 25 アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半の C 末端部分からなると考えられた。他の  $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素とのアミノ酸配列上の相同性の比較、ならびに他の  $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素の幹領域と触媒領域に関する知見 [J. Biol. Chem., 269, 14730-14737(1994)、J. Biol. Chem., 270, 8712-8722(1995)、Glycobiology, 7, 921-927(1997)] を基に、幹領域は少なくとも 25 アミノ酸からなると予想された。したがって、56 番目から 359 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、触媒領域を含むと考えられる。

以下、該 cDNA をマウス Fuc-TIX cDNA、該 cDNA がコードするポリペプチドをマウス Fuc-TIX と呼ぶ。

【0225】

実施例 2. 実施例 1 で取得したマウス F u c - T I X 発現プラスミドを導入したヒト培養細胞における、ルイス x 糖鎖およびルイス y 糖鎖の合成

コントロールプラスミド (p A M o) およびマウス F u c - T I X 発現プラスミド (p A M o - m F T 9) をそれぞれ、 $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$  になるように T E 緩衝液に溶解した後、エレクトロポレーション法により N a m a l w a 細胞に導入し、形質転換細胞を得た。

#### 【0226】

該形質転換細胞について、抗ルイス x 糖鎖抗体 (P M - 8 1、7 3 - 3 0)、抗ルイス y 糖鎖抗体 (A H - 6)、抗シアリルルイス x 糖鎖抗体 (K M 9 3) を用いて間接蛍光抗体染色を行なった。

間接蛍光抗体染色は、実施例 1 の (3) に記載した方法に従って行った。その結果、p A M o - m F T 9 を導入した細胞においては、p A M o を導入した細胞に比較して、抗ルイス x 糖鎖抗体 (P M - 8 1、7 3 - 3 0) への反応性 (ヒストグラムのピーク値) がそれぞれ約 20 倍、抗ルイス y 糖鎖抗体 (A H - 6) への反応性が約 7 倍増加していた。

#### 【0227】

一方、抗シアリルルイス x 糖鎖抗体 (K M 9 3) との反応性はほとんど変化していなかった (図 1 参照)。

また比較のために、他の  $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素 (マウス F u c - T I V、ヒト F u c - T V I) を発現させた N a m a l w a 細胞についても同様の解析を行った。即ち、マウス F u c - T I V 発現プラスミド (p A M o - m F T 4) およびヒト F u c - T V I 発現プラスミド (p A M o - h F T 6) を導入した N a m a l w a 細胞を取得し、該細胞について上記抗体との反応性を調べた (図 1 参照)。

#### 【0228】

同様にして、コントロールプラスミド (p A M o)、マウス F u c - T I X 発現プラスミド (p A M o - m F T 9)、ヒト F u c - T I V 発現プラスミド (p A M o - F T 4) およびヒト F u c - T V I I 発現プラスミド (p A M o - F T 7) を導入した N a m a l w a K J M - 1 細胞を取得し、該細胞について抗ルイス

x糖鎖抗体 (KM380) および抗シアリルルイスx糖鎖抗体 (CSLEX-1, KM93) を用いて間接蛍光抗体染色を行なった (図2参照)。

## 【0229】

また、コントロールプラスミド (pCDM8)、マウスFuc-TIX発現プラスミド (pCDM8-mFT9)、およびヒトFuc-TIII発現プラスミド (pCDM8-Le) を導入したCOS-1細胞を取得し、該細胞について抗ルイスa糖鎖抗体 (7LE、生化学工業社製) を用いて間接蛍光抗体染色を行なった (図3参照)。

## 【0230】

各発現プラスミドの作製法およびCOS-1細胞への導入法は、実施例3に記す。

以上の結果から、Fuc-TIXは形質転換細胞中でルイスx糖鎖およびルイスy糖鎖を合成可能であるが、シアリルルイスx糖鎖およびルイスa糖鎖は合成しないことが示された。この酵素特性は、これまでにクローン化されている $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素のいずれとも異なり、Fuc-TIXは新規な基質特異性を有する新規な $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素であることが判明した。

## 【0231】

Fuc-TIXの基質特異性は、これまでにクローン化された $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素の中ではFuc-TIVに類似しているが、Fuc-TIVがシアリルルイスx糖鎖も合成するのに対して、Fuc-TIXは合成しないという点で明らかに異なっている。

## 【0232】

またこの結果は、Fuc-TIXを細胞で発現させることにより、ルイスx糖鎖またはルイスy糖鎖を含有する糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質を新たに合成できることを意味している。

以上のことより、Fuc-TIXを発現させた細胞を宿主として、有用な糖タンパク質を分泌生産することにより、分泌生産される糖タンパク質にルイスx糖鎖またはルイスy糖鎖を付与することが可能と考えられる。

## 【0233】

## 実施例3 マウスFuc-TIXのin vitro基質特異性

実施例1で取得したマウスFuc-TIX cDNAがコードするFuc-TIXのin vitroでの基質特異性を以下のようにして調べた。

動物細胞でマウスFuc-TIXを発現させるため、マウスFuc-TIX cDNAを動物細胞用発現ベクターpCDM8に以下のようにしてサブクローン化した。

## 【0234】

即ち、pAMo-mFT9から、マウスFuc-TIX cDNAのオープン・リーディング・フレーム(ORF)部分を含む1.2 kbのHindIII-AseI断片を単離し、切断末端をT4 DNAポリメラーゼにより平滑化後、pBluescript SK(-)のEcoRVサイトにサブクローニングした。

## 【0235】

クローニングサイトに隣接したHindIIIサイト側にcDNAの5'側が、PstIサイト側にcDNAの3'側が存在する方向でサブクローニングされているプラスミドを選択し、HindIIIとPstIで切断して、マウスFuc-TIX cDNAを含む1.2 kbの断片を単離した。

該1.2 kbの断片を、pCDM8のHindIII/PstI間にサブクローン化し、マウスFuc-TIX発現プラスミドpCDM8-mFT9を作製した。

## 【0236】

また、他の $\alpha 1$ , 3フコース転移酵素と基質特異性を比較するため、ヒトFuc-TIII cDNA、マウスFuc-TIV cDNA、およびヒトFuc-TVI cDNAを、それぞれpCDM8にサブクローン化した発現プラスミドpCDM8-Le(ヒトFuc-TIII)、pCDM8-mFT4、pCDM8-hFT6を作製した[Glycoconjugate J., 12, 802-812 (1995)、J. Biol. Chem., 269, 29271-29278 (1994)]。

## 【0237】

pCDM8-mFT4は以下のようにして作製した。

Balb/cマウスの胃から実施例1と同様にしてmRNAを調製し、cD

NAを合成した。

該cDNAに対して配列番号8、9に示したプライマーを用いてPCRを行うことによりマウスFuc-TIV cDNAのORF部分を増幅した。

【0238】

増幅に用いたプライマーは末端にEcoRI認識配列を持っているため、増幅断片をEcoRIで切断後、ベクターpBluescript SK(-)のEcoRIサイトにサブクローン化し、pBS-mFT4を作製した。

別にベクターpCDM8をHindIIIで切断し、切断末端をT4DNAポリメラーゼにより平滑化後、EcoRIリンカーを挿入し、HindIIIサイトをEcoRIサイトに変換したベクターを作製した。

該ベクターのEcoRIサイトに、pBS-mFT4のマウスFuc-TIV cDNAを含むEcoRI断片をサブクローン化し、pCDM8-mFT4を作製した。

【0239】

各 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素発現用プラスミド(15 $\mu$ g)を、COS-1細胞 $1 \times 10^7$ 個にそれぞれ導入した。

導入方法はジーンパルサー(Bio-Rad社製)を用いたエレクトロポレーション法で行い、具体的方法はBio-Rad社添付のマニュアルに従った。この際、遺伝子導入効率の指標となるように、ルシフェラーゼ発現ベクター(ベクターpSVOA/L【実験医学, 7, 96(1989)】のHindIIIサイトに $\beta$ -アクトチンプロモーターを挿入したもの)1 $\mu$ gと一緒に遺伝子導入した。

【0240】

遺伝子導入後、各々のCOS-1細胞を径15cmの細胞培養用ディッシュ3枚に分注して48時間培養した。

上記3枚の内の1枚のディッシュを用い、該ディッシュ中の細胞から、後述する実施例4と同様にして全RNAを抽出し、定量的RT-PCRを行い、各 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素遺伝子の転写量を測定した。

【0241】

残り2枚のディッシュを用い、該ディッシュ中の細胞を回収し、溶液〔20

mM HEPES (pH 7.4)、2% Triton X-100] に懸濁後、短時間超音波にかけて細胞溶解液を調製した。該細胞溶解液の蛋白質濃度はマイクロBCA蛋白質アッセイ試薬キット (PIERCE社) により測定した。

該細胞溶解液を用いて、ルシフェラーゼおよび $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素の酵素活性を測定した。

#### 【0242】

ルシフェラーゼ活性は文献 [J. Biol. Chem., 269, 29271-29278 (1994)] 記載の方法で測定し、遺伝子導入効率の検定をした。

その結果、いずれの遺伝子を導入したCOS-1細胞においても、ルシフェラーゼ活性は誤差 $\pm 20\%$ 以内ではほぼ一定であり、遺伝子の導入効率にはフコース転移酵素遺伝子間で大きな差はみられなかった。

#### 【0243】

また、RT-PCRによって測定した各フコース転移酵素遺伝子の発現量と導入効率はほぼ同じであった。

サンプル間の遺伝子導入効率を完全に合わせるため、容積あたりのルシフェラーゼ活性が一定になるように各細胞溶解液を希釈した。

#### 【0244】

ピリジルアミノ化した糖鎖基質の調製や活性測定は、既知の方法 [特開平06-823021、J. Biol. Chem. 269, 14730-14737(1994)] に準じて行った。

具体的には、活性測定は、 $10\mu\text{l}$  のアッセイ溶液 [50 mM カコジル酸-HCl (pH 6.8)、5 mM ATP (SIGMA社)、 $75\mu\text{M}$  GDP-Fuc (SIGMA社)、10 mM L-Fuc (SIGMA社)、 $25\mu\text{M}$  ピリジルアミノ化糖鎖基質、上記細胞溶解液] 中で $37^\circ\text{C}$ 、2時間反応後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により生産物を同定することにより行った。

#### 【0245】

基質として、ラクト-N-ネオテトラオース (Lacto-N-neotetraose, Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc; 以下、LNnTと略記する)、ラクト-N-テトラオース (Lacto-N-tetraose, Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc; 以下、

LNTと略記する) (いずれもオックスフォード・グライコシステムズ社製) をアミノピリジンで蛍光標識したもの、およびアミノピリジンで蛍光標識されたLNnTを基質として分泌型の $\alpha 2,3$ -シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)を反応させることにより、アミノピリジンで蛍光標識されたシアリルラクトーN-ネオテトラオース(Sialyllacto-N-neotetraose, NeuAc $\alpha 2$ -3Gal $\beta 1$ -4GlcNAc $\beta 1$ -3Gal $\beta 1$ -4Glc; 以下、 $\alpha 2,3$ -シアリルLNnTと略記する)を用いた。

## 【0246】

スタンダードとして、ラクトーN-フコペンタオースII [Lacto-N-fucopentaose II, Gal $\beta 1$ -3(Fuc $\alpha 1$ -4)GlcNAc $\beta 1$ -3Gal $\beta 1$ -4Glc; 以下、LNFP-I Iと略記する]、ラクトーN-フコペンタオースIII [Lacto-N-fucopentaose III, Gal $\beta 1$ -4(Fuc $\alpha 1$ -3)GlcNAc $\beta 1$ -3Gal $\beta 1$ -4Glc; 以下、LNFP-I I Iと略記する]、(いずれもオックスフォード・グライコシステムズ社製)をアミノピリジンで蛍光標識したもの、およびアミノピリジンで蛍光標識された $\alpha 2,3$ -シアリルLNnTを基質としてFuc-TV Iの分泌型酵素を反応させることにより調製したシアリルラクトーN-フコペンタオースIII [Sialyllacto-N-fucopentaose III, NeuAc $\alpha 2$ -3Gal $\beta 1$ -4(Fuc $\alpha 1$ -3)GlcNAc $\beta 1$ -3Gal $\beta 1$ -4Glc;  $\alpha 2,3$ -シアリルLNFP-III]を用いた。

## 【0247】

基質の蛍光標識は、常法 [Agric. Biol. Chem., 54, 2169 (1990)] に従って行った。

それぞれの基質について、GDP-Fuc (糖供与体)を含むアッセイ溶液と含まないアッセイ溶液を用いて反応後、HPLCで解析し、GDP-Fucを含むアッセイ溶液でのみ出現するピークを生成物とした。

## 【0248】

反応が終了したアッセイ溶液は、100℃で3分間処理後、10,000×gで5分間遠心して上清を取得し、その一部をHPLCに供した。

HPLCは、TSK-gel ODS-80Tsカラム(4.6×300mm; 東ソー)を使用し、溶出液として0.02M 酢酸アンモニウム緩衝液(pH4.0)を用い、溶出温度35℃、流速1ml/分の条件で行った。



## 【0249】

生成物の検出は、蛍光スペクトルフォトメーターFP-920（日本分光）を用いて行った（励起波長320nm、放射波長400nm）。

生成物の同定は、スタンダードの糖鎖と溶出時間が一致することを指標とした。

生成物の定量は、アミノピリジル化したラクトースをスタンダードとして用い、蛍光強度を比較することにより行った。

## 【0250】

反応生成物の量を、上記で測定した各 $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素遺伝子の転写量に基づいて校正し、活性とした。

ヒトFuc-TVIの $\alpha$ 2,3-シアリルLNnTを基質とした時の活性を100として、各 $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素の各基質に対する相対活性を求めた。

結果を第1表に示す。なお、コントロールプラスミド（pCDM8）を導入したCOS-1細胞では、いずれの基質を用いた場合にも活性は検出されなかった。

## 【0251】

【表1】

第1表  $\alpha$ 1,3-フコース転移酵素の各基質に対する相対活性

基 質	マウス Fuc-TIX	マウス Fuc-TIV	ヒト Fuc-TIII	ヒト Fuc-TVI
LNT	0	0	123.3	0
LNnT	83.8	51.6	32.3	63.7
$\alpha$ 2,3-シアリル LNnT	0	4.5	16.4	100

マウスFuc-TIXはLNnTに対してのみ強い活性を示した。

ヒトFuc-TIIIは、LNT、LNnT、および $\alpha$ 2,3-シアリルLNnT

の全てに活性を示した(LNTに最も強い活性)。

マウスFuc-TIVはLNnTに強い活性、 $\alpha 2,3$ -シアリルLNnTに弱い活性を示した。

ヒトFuc-TVIは、 $\alpha 2,3$ -シアリルLNnTおよびLNnTに活性を示した( $\alpha 2,3$ -シアリルLNnTに最も強い活性)。

#### 【0252】

Fuc-TIXの*in vitro*基質特異性は、これまでに精製またはクローン化されたいずれの $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素の基質特異性とも異なることから、Fuc-TIXは新規な基質特異性をもつ $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素であることが証明された。

Fuc-TIXの*in vitro*の基質特異性は、実施例2で示された細胞中でのFuc-TIXの基質特異性とよく一致していた。また、Fuc-TIXは他の $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素に比較して、LNnTのGlcNAc残基に $\alpha 1,3$ 結合でFucを転移する活性が強いことも明らかとなり、ルイスx糖鎖の合成に有用であることが示された。

#### 【0253】

実施例4 Fuc-TIX遺伝子の各種臓器での発現

##### (1) ノーザンブロットによる解析

マウス各組織(脳、胸腺、胃、肝臓、脾臓、腎臓、大腸、子宮、卵巣、肺、精巣、小腸、副睾丸)より実施例1と同様にしてPoly(A)<sup>+</sup>RNAを単離し、5 $\mu$ gを、変性溶液[50%(v/v)ホルムアミド、2.2Mホルムアルデヒド、20mM MOPS[3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸](PH7.0)、5mM 酢酸ナトリウム、1mM EDTA]中で65℃で5分間加熱して変性させ、2.2Mホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルで電気泳動した。

電気泳動後、ゲル中のRNAをニトロセルロースフィルター(Optimal BA-S 85; Schleicher & Schuell社)上にブロッティングし、減圧下80℃で1時間加熱し固定化した。

#### 【0254】

該フィルターをハイブリダイゼーション溶液〔5×SSPE (750 mM NaCl、50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、5 mM EDTA; pH 7.4)、5×デンハルト溶液 (0.1% フィコール、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% ウシ血清アルブミン)、1% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、0.2 mg/ml のサケ精子DNA (Pharmacia Biotech社)) 中に浸漬しプレハイブリダイゼーションを行った。

## 【0255】

プレハイブリダイゼーション後、該溶液にプローブを添加し、さらに65℃でハイブリダイゼーションを行った。

プローブとしては、pAMo-mFT9中のマウスFuc-TIXのORFを含むHindIII-AseI断片を、マルチプライムDNA標識システム (アマシャム社) を用いて<sup>32</sup>Pで標識したものをを用いた。

ハイブリダイゼーション後のフィルターを0.1% SDSを含む0.1×SSC (15 mM NaCl、1.5 mM クエン酸ナトリウム) で2回洗浄した後、イメージングプレートを感光させ、バイオイメージングアナライザーBAS2000 (富士写真フィルム) でマウスFuc-TIX mRNAのバンドを検出した。

## 【0256】

この結果、脳と腎臓で5.5 kbと3.0 kbの2種類のバンドが見られたが、他の組織ではバンドは検出されなかった。従って、Fuc-TIX遺伝子は主に腎臓と脳で発現していることが判明した。脳と腎臓でのノーザンブロットの結果を図4に示した。

## 【0257】

(2) RT-PCRを用いた各種臓器におけるFuc-TIX転写物の定量

Fuc-TIX遺伝子の発現量を臓器ごとに定量するため、定量的RT-PCRを行った。

検量線の作成に用いるスタンダード用プラスミドとしては、pAMo-mFT9のFuc-TIX cDNAを含む約1.8 kbのHindIII-KpnI断片をベクターpBluescript SK(-)のHindIII/KpnI間にサブクロ-

ニングしたpBS-mFT9を用いた。

【0258】

pBS-mFT9を制限酵素XcmIとBpu1120Iで切断し、末端をT4 DNAポリメラーゼによって平滑化した後、再度ライゲーションすることにより、Fuc-TIXcDNA中のXcmI-Bpu1120I間127bpを欠失させたpBS-mFT9dを作成した。

該pBS-mFT9dをRT-PCRの際競合させる内部コントロール用プラスミドとして用いた。

【0259】

マウス $\beta$ -アクチンcDNAの取得を、実施例3のマウスFuc-TIVcDNAの取得法に準じて、以下のように行った。該マウス $\beta$ -アクチンcDNAをcDNA合成の指標となるコントロールとして用いた。

マウス胃mRNA由来の1本鎖を鋳型として、配列番号10、11に示したプライマーを用いてPCRを行うことにより、マウス $\beta$ -アクチンcDNAを増幅した。

【0260】

増幅に用いた配列番号10のプライマーは末端にEcoRI認識配列、配列番号11のプライマーは末端にHindIII認識配列を持っているので、増幅断片をEcoRIとHindIIIで切断後、ベクターpBluescript SK(-)のEcoRIサイトとHindIIIサイトにサブクローン化し、 $\beta$ -アクチン遺伝子のスタンダード用プラスミドpBS-m $\beta$ -actinを作製した。

また、pBS-m $\beta$ -actinを制限酵素MscIおよびBstEIIで切断し、末端をT4 DNAポリメラーゼによって平滑化した後、再度ライゲーションすることにより、 $\beta$ -アクチンcDNA中のMscI-BstEII間208bpを欠失させたpBS-m $\beta$ -actindを作成し、内部コントロール用プラスミドとして用いた。

【0261】

比較のために、マウスFuc-TIV遺伝子の発現分布も検討した。スタン

ダードプラスミドとしては、実施例3で作製した pBS-mFT4 を使用した。また、pBS-mFT4 を制限酵素 EcoNI および Csp45I で切断し、末端を T4 DNA ポリメラーゼによって平滑化した後、再度ライゲーションすることにより、マウス Fuc-TIV cDNA 中の EcoNI - Csp45I 間 168 bp を欠失させた pBS-mFT4 d を作成し、内部コントロール用プラスミドとして用いた。

## 【0262】

成体 BALB/c マウスの各組織（脳、胸腺、胃、肝臓、脾臓、腎臓、大腸、子宮、卵巣、肺、心臓、精巣、小腸、副睾丸）から酸グアニジウム チオシアネート フェノールクロロホルム法 [Anal. Biochem. 162, 156-159] により全 RNA を抽出した。

## 【0263】

全 RNA 各々 6  $\mu$ g に、デオキシリボヌクレアーゼ I (Life Technologies 社製) を 5 単位/ml ずつ添加し、室温で 5 分間反応させた。

反応後、65℃で 15 分間加熱することにより、酵素を失活させた。

得られた全 RNA 各々について、オリゴ (dT) プライマーを用いて SUPERS CRIP<sup>TM</sup> Preamplification System for First Strand cDNA System (Life Technologies 社) により cDNA を合成した。反応は 20  $\mu$ l で行い、反応後の溶液を水で 50 倍希釈し、使用するまで -80℃で保管した。

## 【0264】

上述の各組織由来の cDNA 10  $\mu$ l および内部コントロール用プラスミド 10  $\mu$ l (10 fg) を含む 50  $\mu$ l の反応溶液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM dNTP、0.001% (w/v) ゼラチン、0.2  $\mu$ M 遺伝子特異的プライマー] で、DNA ポリメラーゼ AmpliTaq Gold<sup>TM</sup> (Parkin Elmer 社) を用いて PCR を行った。

Fuc-TIX 特異的プライマーの塩基配列を配列番号 12、13 に、 $\beta$ -アクチン特異的プライマーの塩基配列を配列番号 14、15 に、Fuc-TIV 特異的プライマーの塩基配列を配列番号 16、17 に示した。

## 【0265】

このプライマーにより、マウスFucTIX cDNAについては530bp、pBS-mFT9dからは403bpの断片が増幅し、 $\beta$ -アクチンcDNAについては792bp、pBS-m $\beta$ -actindからは584bpの断片を増幅させることができる。また、マウスFucTIV cDNAについては511bp、pBS-mFT4dからは343bpの断片を増幅させることができる。

## 【0266】

PCRの条件は、95℃で11分間の加熱後、95℃で1分間、65℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、Fuc-TIXとFuc-TIVについては38～42サイクル、 $\beta$ -アクチンについては22～26サイクルの反応を行った。

## 【0267】

反応後の溶液のうち10 $\mu$ lを1%のアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、写真を撮影した。写真をNIHイメージシステムによりスキニングすることにより増幅した断片の染色の強さを測定し、増幅量とした。

組織cDNAのかわりにスタンダードプラスミドを1.25fg、2.5fg、5fg、10fg、20fg、40fg用いて、PCRを行い、増幅断片の増幅量を測定し、cDNAの量と断片の増幅量をプロットして検量線を作成した。

## 【0268】

この検量線と各組織cDNAでの断片の増幅量から、各組織でのcDNAの量を計算し、これを各組織でのmRNA転写量すなわち遺伝子の発現量とした。なお、 $\beta$ -アクチンは各組織で普遍的に発現している遺伝子と考えられるので、どの組織においてもその発現量は同程度と考えられる。従って、各組織における $\beta$ -アクチン遺伝子の発現量の差は、cDNA合成反応の効率の差と考えられるのでFuc-TIX遺伝子の発現量を比較する際に $\beta$ -アクチンの発現量も考慮した。

結果を図5に示した。

【0269】

Fuc-TIX遺伝子は、腎臓で最も多く、それに次いで脳で多く発現していることがわかった。また、胃、大腸、子宮、副睾丸でも発現が確認された。しかし、胸腺、肝臓、脾臓、卵巣、肺、心臓、精巣、小腸では発現はみられなかった。マウスFuc-TIX遺伝子の発現分布は、マウスFuc-TIV遺伝子の発現分布とは明らかに異なっていた（図5参照）。

【0270】

実施例5 in situハイブリダイゼーションによるマウスFuc-TIX遺伝子の脳内発現分布の解析

配列番号18、19に塩基配列を示したプライマーセットを用いて、マウスFuc-TIX cDNAの一部を増幅し、この増幅断片をTAクローニング用ベクターpCR3（Invitrogen社）へサブクローニングした。

同様にして別のプライマーセット（塩基配列を配列番号20および21に示した）を用いて、マウスFuc-TIX cDNAの一部の断片を増幅し、pCR3にサブクローニングした。

【0271】

増幅断片の方向を確認後、これらのプラスミドをHind IIIで切断後、ジゴキシゲニン標識用ミックス（Boehringer Mannheim社）を用いて、SP6 RNAポリメラーゼによってインビトロ転写反応を行うことにより、ジゴキシゲニン標識されたアンチセンス・リボプローブあるいはセンス・リボプローブを作製した（アンチセンスかセンスかどうかは増幅断片の方向による）。また、これらのプラスミドをXho Iで切断後、同様にT7 RNAポリメラーゼによってインビトロ転写反応を行うことにより、ジゴキシゲニン標識されたアンチセンス・リボプローブあるいはセンス・リボプローブを作製した（アンチセンスかセンスかどうかは増幅断片の方向による）。

【0272】

成体BALB/cマウスの脳組織を4%パラホルムアルデヒド中で一晚処理して固定化し、パラフィンに包埋した。

該パラフィンに包埋した脳組織を用い、該脳組織の切片を作製後、切片のパラフィンを除去し水和させた。

該脳組織切片を0.2M 塩酸で20分間処理することにより、組織中に元からあるアルカリホスファターゼを不活化した後、4  $\mu$ g/ml プロテアーゼK (Boehringer Mannheim社) を添加し37℃で15分間反応させた。

該切片を4% パラホルムアルデヒド/PBS (w/v) 中で10分間処理して固定化後、非特異的な染色を避けるために、0.2% グリシン/PBS (w/v) 中に10分間浸した。

#### 【0273】

該切片を脱水後、ハイブリダイゼーション溶液〔50% ホルムアルデヒド、10% 硫酸デキストラン、1×デンハルト溶液、10mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA、0.6M NaCl、200  $\mu$ g/ml 酵母tRNA〕中で、リボプローブと50℃で16時間ハイブリダイズさせた。

該切片を、2×SSCで室温で15分間、2回洗浄後、0.1×SSCで50℃で30分間洗浄した。

#### 【0274】

抗ジゴキシゲニン抗体とNBT/BCIP溶液 (Boehringer Mannheim社) を用いてプローブとハイブリダイズしたシグナルを検出した。

結果の一例を図6に示す。

#### 【0275】

アンチセンスプローブを用いた際には、海馬のニューロン細胞体で染色がみられ、Fuc-TIX mRNAの発現が検出されたが、グリア細胞では発現が検出されなかった。

一方、ネガティブコントロールとして用いたセンスプローブでは、いずれの細胞についても染色はみられなかった。

以上のことから、マウスFuc-TIX遺伝子はニューロン細胞体で発現しており、グリア細胞では発現していないことが判明した。

#### 【0276】



## 実施例6 ヒトFuc-TIX染色体DNAのクローン化

マウスFuc-TIXc DNAに対応するヒトの遺伝子として、ヒトFuc-TIX染色体DNAのクローン化を行った。

まず、マウスFuc-TIX遺伝子に特異的なプライマー（塩基配列を配列番号22および23に示した）を用いたPCRにより、ヒト染色体DNAライブラリー（PACライブラリー）をスクリーニングすることにより、ヒトFuc-TIX染色体DNAを含有するクローンの取得を行った。

## 【0277】

該PACライブラリーの各クローンのうち、405504クローンを、1056枚の384穴プレート（縦16×横24穴）上に1クローン／穴になるようにして培養後、このプレート1056枚を横（X軸：1～12）12枚、縦（Y軸：A～H）8枚、高さ（Z軸：1～11）11枚に積み重ねた。各（Z，Y）座標ごとにX軸方向の12プレート分の全てのクローンを混合し88個のプールを作製した。

別に、各（Z，X）座標ごとにY軸方向の8プレート分の全てのクローンを混合し132個のプールを作製した。

## 【0278】

上記88個のプールについて上記プライマーを用いたPCRを行い、どの（Z，Y）座標のプールを鋳型として用いた時にヒトFuc-TIX遺伝子断片が増幅されるか調べた結果、（Z，Y）座標が（8，H）に存在するプールにヒトFuc-TIX遺伝子を含むクローンの存在が認められた。

同様に、上記132プールのうち、特定したZ座標8を含む（8，1～12）の12個のプールについて同様のPCRを行い、（Z，X）座標が（8，12）に存在するプールにヒトFuc-TIX遺伝子を含むクローンの存在が認められた。

## 【0279】

以上の結果より、ヒトFuc-TIX遺伝子を含むクローンは（Z，Y，X）座標（8，H，12）に存在することがわかった。

特定した座標（8，H，12）のプレート上に存在する384種の各クロー

ンを、384（縦16×横24）穴プレート用の剣山で同時につついて、2×TY培地の入った縦溝プレート（384穴プレートの縦16穴がつながった24本の縦溝をもつプレート）および横溝プレート（384穴プレートの横24穴がつながった16本の横溝をもつプレート）に植菌し、一晚培養した。

各溝の培養液（40種）のうち1 $\mu$ lを鋳型として上記と同様のPCRを行い、ヒトFuc-TIX遺伝子断片の増幅が見られた縦溝と横溝の交点の座標を求めることにより、ヒトFuc-TIX遺伝子を含むクローンの存在する座標を特定した。

## 【0280】

特定した座標のクローンからプラスミドDNAを単離し、HindIIIまたはEcoRIで切断後、マウスFuc-TIX cDNA断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションに供した。プローブの作製法を以下に示す。

マウスFuc-TIX cDNAを鋳型として、配列番号24および25に示したプライマーを用いてPCRを行うことにより、マウスFuc-TIX cDNA断片を増幅した。

## 【0281】

次いで、該断片をマルチプライムDNA標識システム（アマシャム社）を用いて<sup>32</sup>Pで標識し、プローブとした。

サザンハイブリダイゼーションの結果、約2.7kbのHindIII断片と約1.5kbのEcoRI断片がマウスFuc-TIX cDNAとハイブリダイズした。

## 【0282】

ハイブリダイズの結果より、これらの断片がヒトFuc-TIX染色体由来の断片であると考え、該約2.7kbのHindIII断片をベクターpBluescript SK(-)のHindIIIサイトにサブクローン化し、pBS-hgFT9Hを作製した。

また、該約1.5kbのEcoRI断片をベクターpBluescript SK(-)のEcoRIサイトにサブクローン化し、pBS-hgFT9Eを作製した。

pBS-hgFT9HおよびpBS-hgFT9Eの塩基配列を実施例1と同様にして決定し、その結果をつなぎ合わせることにより、ヒトFuc-TIX染色体DNAの塩基配列(2822bp)を決定した。該塩基配列を配列番号4に示した。

#### 【0283】

ヒトFuc-TIX染色体は、359アミノ酸からなるポリペプチドをコードするORFを有していた。該アミノ酸配列はマウスFuc-TIXのアミノ酸配列(配列番号2に示す)と99.2%(359アミノ酸中356アミノ酸が一致)のホモロジーを示したことから、配列番号4の1289~2368番目の領域は、イントロンを含まないヒトFuc-TIXをコードする塩基配列であると結論した。

ヒトFuc-TIXのアミノ酸配列を配列番号2に示す。

#### 【0284】

##### 実施例7 ヒトFuc-TIX cDNAのクローン化

ヒト胃粘膜のPoly(A)<sup>+</sup>RNAよりcDNA合成システム(cDNA Synthesis System、GIBCO BRL社製)を用いてcDNAを合成し、その両端にEcoRI-NotI-SalI adaptor (SuperScript Choice System for cDNA Synthesis; GIBCO BRL社製)を付加した後、クローニングベクターλZAP II(λZAP II/EcoRI/CIAP Cloning Kit、STRATAGENE社製)のEcoRI部位に挿入し、Stratagene社 Gigapack III Gold Packaging Extractを用いてin vitro packagingを行うことにより、cDNAライブラリーを作製した。

#### 【0285】

実施例6で取得したヒトFuc-TIX染色体を含むPACクローンを鋳型として、配列番号26および27に示したプライマーを用いてPCRを行うことにより、ヒトFuc-TIX染色体断片を増幅した。

該断片をマルチプライムDNA標識システム(アマシャム社)を用いて<sup>32</sup>Pで標識し、プローブを作製した。

#### 【0286】

該プローブを用いて、上記で作製したcDNAライブラリー5×10<sup>5</sup>クロ

ーンについてブランクハイブリダイゼーションを行った。

該ハイブリダイゼーションにおいて、フィルターを、2倍濃度のSSPE〔1倍濃度のSSPEの組成は、180mM 塩化ナトリウム、10mM リン酸二水素ナトリウム、1mM エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)よりなる(pH7.4)〕、0.1% SDSよりなる緩衝液中で65℃、10分間浸漬する条件で2回、1倍濃度のSSPE、0.1% SDSからなる緩衝液中で65℃、15分間浸漬する条件で1回、0.2xSSPE、0.1% SDSからなる緩衝液中で65℃、10分間浸漬する条件で2回洗浄した。

#### 【0287】

該ブランクハイブリダイゼーションの結果、ハイブリダイズする4個の独立したクローンが得られた。Stratagene社のマニュアルに従ってin vivo excisionを行い、該クローンよりそれぞれプラスミドを回収し、制限酵素解析、塩基配列決定を行った。

#### 【0288】

塩基配列決定の結果、回収したプラスミドの一つであるpBS-hFT9(S2)には、配列番号5に記載した約2.7kbのcDNAが含まれることが判明した。

該cDNAは、ヒトFuc-TIX染色体がコードするポリペプチドと同じアミノ酸配列(配列番号2に示す)を有するポリペプチドをコードしていた。pBS-hFT9(S2)を含む大腸菌であるEscherichia coli SOLR<sup>TM</sup> strain/pBS-hFT9(S2)は、平成10年7月10日付で工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-6416として寄託されている。

pBS-hFT9(S2)の構造を図7に示す。

#### 【0289】

##### 【発明の効果】

本発明は、ルイスx糖鎖およびルイスy糖鎖を合成する活性を有し、かつシアリルルイスx糖鎖を合成する活性を有しない新規な基質特異性を有するα1,3-フコース転移酵素活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAの製造法、該DNAを組

み込んで得られる組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法および免疫染色法、該ポリペプチドを用いたFuc含有糖鎖の製造法、該組換え体ベクターを含有する形質転換体を用いたFuc含有糖鎖の製造法、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質のスクリーニング法、該ポリペプチドの有する活性を変動させる物質のスクリーニング法、該DNAあるいは該抗体を用いた脳疾患、腎疾患または癌等の疾患の診断法、該DNA、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質あるいは該ポリペプチドの有する活性を変動させる物質を用いた脳疾患、腎疾患または癌等の疾病の治療法を提供することができる。

## 【0290】

## 「配列表フリーテキスト」

配列番号6－人工配列の説明：合成DNA  
配列番号7－人工配列の説明：合成DNA  
配列番号8－人工配列の説明：合成DNA  
配列番号9－人工配列の説明：合成DNA  
配列番号10－人工配列の説明：合成DNA  
配列番号11－人工配列の説明：合成DNA  
配列番号12－人工配列の説明：合成DNA  
配列番号13－人工配列の説明：合成DNA  
配列番号14－人工配列の説明：合成DNA  
配列番号15－人工配列の説明：合成DNA  
配列番号16－人工配列の説明：合成DNA  
配列番号17－人工配列の説明：合成DNA  
配列番号18－人工配列の説明：合成DNA  
配列番号19－人工配列の説明：合成DNA  
配列番号20－人工配列の説明：合成DNA  
配列番号21－人工配列の説明：合成DNA  
配列番号22－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 23 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 24 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 25 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 26 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号 27 - 人工配列の説明：合成DNA

【0291】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> NOVEL PEPTIDE

<130> H10-0981N2

<140>

<141>

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.0

【0292】

<210> 1

<211> 359

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met Thr Ser Thr Ser Lys Gly Ile Leu Arg Pro Phe Leu Ile Val Cys

1

5

10

15

Ile Ile Leu Gly Cys Phe Met Ala Cys Leu Leu Ile Tyr Ile Lys Pro

20

25

30

Thr Asn Ser Trp Val Phe Ser Pro Met Glu Ser Ala Ser Ser Val Leu  
35 40 45

Lys Met Lys Asn Phe Phe Ser Thr Lys Thr Asp Tyr Phe Asn Glu Thr  
50 55 60

Thr Ile Leu Val Trp Val Trp Pro Phe Gly Gln Thr Phe Asp Leu Thr  
65 70 75 80

Ser Cys Gln Ala Met Phe Asn Ile Gln Gly Cys His Leu Thr Thr Asp  
85 90 95

Arg Ser Leu Tyr Asn Lys Ser His Ala Val Leu Ile His His Arg Asp  
100 105 110

Ile Ser Trp Asp Leu Thr Asn Leu Pro Gln Gln Ala Arg Pro Pro Phe  
115 120 125

Gln Lys Trp Ile Trp Met Asn Leu Glu Ser Pro Thr His Thr Pro Gln  
130 135 140

Lys Ser Gly Ile Glu His Leu Phe Asn Leu Thr Leu Thr Tyr Arg Arg  
145 150 155 160

Asp Ser Asp Ile Gln Val Pro Tyr Gly Phe Leu Thr Val Ser Thr Asn  
165 170 175

Pro Phe Val Phe Glu Val Pro Ser Lys Glu Lys Leu Val Cys Trp Val



180

185

190

Val Ser Asn Trp Asn Pro Glu His Ala Arg Val Lys Tyr Tyr Asn Glu

195

200

205

Leu Ser Lys Ser Ile Glu Ile His Thr Tyr Gly Gln Ala Phe Gly Glu

210

215

220

Tyr Val Asn Asp Lys Asn Leu Ile Pro Thr Ile Ser Thr Cys Lys Phe

225

230

235

240

Tyr Leu Ser Phe Glu Asn Ser Ile His Lys Asp Tyr Ile Thr Glu Lys

245

250

255

Leu Tyr Asn Ala Phe Leu Ala Gly Ser Val Pro Val Val Leu Gly Pro

260

265

270

Ser Arg Glu Asn Tyr Glu Asn Tyr Ile Pro Ala Asp Ser Phe Ile His

275

280

285

Val Glu Asp Phe Asn Ser Pro Ser Glu Leu Ala Lys Tyr Leu Lys Glu

290

295

300

Val Asp Lys Asn Asn Lys Leu Tyr Leu Ser Tyr Phe Asn Trp Arg Lys

305

310

315

320

Asp Phe Thr Val Asn Leu Pro Arg Phe Trp Glu Ser His Ala Cys Leu

325

330

335

Ala Cys Asp His Val Lys Arg His Gln Glu Tyr Lys Ser Val Gly Asn

340

345

350

Leu Glu Lys Trp Phe Trp Asn

355

【0293】

<210> 2

<211> 359

<212> PRT

<213> human

<400> 2

Met Thr Ser Thr Ser Lys Gly Ile Leu Arg Pro Phe Leu Ile Val Cys

1

5

10

15

Ile Ile Leu Gly Cys Phe Met Ala Cys Leu Leu Ile Tyr Ile Lys Pro

20

25

30

Thr Asn Ser Trp Ile Phe Ser Pro Met Glu Ser Ala Ser Ser Val Leu

35

40

45

Lys Met Lys Asn Phe Phe Ser Thr Lys Thr Asp Tyr Phe Asn Glu Thr

50

55

60

Thr Ile Leu Val Trp Val Trp Pro Phe Gly Gln Thr Phe Asp Leu Thr

65

70

75

80

Ser Cys Gln Ala Met Phe Asn Ile Gln Gly Cys His Leu Thr Thr Asp

85

90

95

Arg Ser Leu Tyr Asn Lys Ser His Ala Val Leu Ile His His Arg Asp

100

105

110

Ile Ser Trp Asp Leu Thr Asn Leu Pro Gln Gln Ala Arg Pro Pro Phe

115

120

125

Gln Lys Trp Ile Trp Met Asn Leu Glu Ser Pro Thr His Thr Pro Gln

130

135

140

Lys Ser Gly Ile Glu His Leu Phe Asn Leu Thr Leu Thr Tyr Arg Arg

145

150

155

160

Asp Ser Asp Ile Gln Val Pro Tyr Gly Phe Leu Thr Val Ser Thr Asn

165

170

175

Pro Phe Val Phe Glu Val Pro Ser Lys Glu Lys Leu Val Cys Trp Val

180

185

190

Val Ser Asn Trp Asn Pro Glu His Ala Arg Val Lys Tyr Tyr Asn Glu

195

200

205

Leu Ser Lys Ser Ile Glu Ile His Thr Tyr Gly Gln Ala Phe Gly Glu

210

215

220

Tyr Val Asn Asp Lys Asn Leu Ile Pro Thr Ile Ser Ala Cys Lys Phe

225

230

235

240

Tyr Leu Ser Phe Glu Asn Ser Ile His Lys Asp Tyr Ile Thr Glu Lys

245

250

255

Leu Tyr Asn Ala Phe Leu Ala Gly Ser Val Pro Val Val Leu Gly Pro

260

265

270

Ser Arg Glu Asn Tyr Glu Asn Tyr Ile Pro Ala Asp Ser Phe Ile His

275

280

285

Val Glu Asp Tyr Asn Ser Pro Ser Glu Leu Ala Lys Tyr Leu Lys Glu

290

295

300

Val Asp Lys Asn Asn Lys Leu Tyr Leu Ser Tyr Phe Asn Trp Arg Lys

305

310

315

320

Asp Phe Thr Val Asn Leu Pro Arg Phe Trp Glu Ser His Ala Cys Leu

325

330

335

Ala Cys Asp His Val Lys Arg His Gln Glu Tyr Lys Ser Val Gly Asn

340

345

350

Leu Glu Lys Trp Phe Trp Asn

355

【0294】

<210> 3

<211> 2170

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (115)..(1191)

<400> 3

ctttccctcg ctgggatcgc tttagaatgt gataactcac gcatctgata gcaccgtgga 60

gtagttcagc actcatctct gctttccatg ctatgttctc tacactgaaa aatt atg 117

Met

1

aca tca aca tcc aaa ggc att ctt cgc cca ttt cta atc gtc tgc atc 165

Thr Ser Thr Ser Lys Gly Ile Leu Arg Pro Phe Leu Ile Val Cys Ile

5

10

15

atc ctg ggc tgc ttc atg gca tgt ctg ctc att tat atc aag ccc acc 213

Ile Leu Gly Cys Phe Met Ala Cys Leu Leu Ile Tyr Ile Lys Pro Thr

20

25

30

aac agc tgg gtc ttc agt cca atg gag tct gca agt tct gtg ctg aaa 261

Asn Ser Trp Val Phe Ser Pro Met Glu Ser Ala Ser Ser Val Leu Lys

35	40	45	
atg aaa aat ttc ttc tcc aca aaa act gat tat ttt aac gaa act acc 309			
Met Lys Asn Phe Phe Ser Thr Lys Thr Asp Tyr Phe Asn Glu Thr Thr			
50	55	60	65
att ctg gtt tgg gta tgg cca ttt ggg cag acc ttt gac ctt aca tcc 357			
Ile Leu Val Trp Val Trp Pro Phe Gly Gln Thr Phe Asp Leu Thr Ser			
70	75	80	
tgc caa gca atg ttc aat atc caa ggg tgc cat ctc aca aca gac cgc 405			
Cys Gln Ala Met Phe Asn Ile Gln Gly Cys His Leu Thr Thr Asp Arg			
85	90	95	
tca ttg tac aac aaa tcc cat gcg gtc ctg att cac cat aga gac atc 453			
Ser Leu Tyr Asn Lys Ser His Ala Val Leu Ile His His Arg Asp Ile			
100	105	110	
agc tgg gat ctg act aac tta cct cag cag gcc agg cca ccc ttt cag 501			
Ser Trp Asp Leu Thr Asn Leu Pro Gln Gln Ala Arg Pro Pro Phe Gln			
115	120	125	
aaa tgg att tgg atg aat tta gag tca ccc act cac acc ccc caa aag 549			

Lys Trp Ile Trp Met Asn Leu Glu Ser Pro Thr His Thr Pro Gln Lys  
130 135 140 145

agt ggc att gaa cac ttg ttc aac ctg act cta act tat cgc cgt gat 597

Ser Gly Ile Glu His Leu Phe Asn Leu Thr Leu Thr Tyr Arg Arg Asp  
150 155 160

tca gat atc caa gtg cct tat ggc ttc ttg acg gtg agc aca aat ccc 645

Ser Asp Ile Gln Val Pro Tyr Gly Phe Leu Thr Val Ser Thr Asn Pro  
165 170 175

ttt gtg ttt gaa gtg cca agc aag gag aag ttg gtg tgc tgg gtt gtg 693

Phe Val Phe Glu Val Pro Ser Lys Glu Lys Leu Val Cys Trp Val Val  
180 185 190

agt aac tgg aac cct gag cat gcc agg gtc aag tat tac aac gag ctc 741

Ser Asn Trp Asn Pro Glu His Ala Arg Val Lys Tyr Tyr Asn Glu Leu  
195 200 205

agc aag agt att gaa atc cac acc tat ggc caa gca ttc gga gaa tac 789

Ser Lys Ser Ile Glu Ile His Thr Tyr Gly Gln Ala Phe Gly Glu Tyr  
210 215 220 225

gtg aac gat aaa aat ctg att ccc acc ata tct act tgt aaa ttt tat 837

Val Asn Asp Lys Asn Leu Ile Pro Thr Ile Ser Thr Cys Lys Phe Tyr

230

235

240

ctt tca ttt gaa aac tca att cac aaa gat tac atc aca gaa aag ctc 885

Leu Ser Phe Glu Asn Ser Ile His Lys Asp Tyr Ile Thr Glu Lys Leu

245

250

255

tac aat gca ttt ttg gct ggt tca gta cct gtt gtc ctg ggt cca tct 933

Tyr Asn Ala Phe Leu Ala Gly Ser Val Pro Val Val Leu Gly Pro Ser

260

265

270

agg gaa aac tat gag aat tat att cca gct gat tca ttc att cat gtg 981

Arg Glu Asn Tyr Glu Asn Tyr Ile Pro Ala Asp Ser Phe Ile His Val

275

280

285

gaa gat ttt aac tct ccc agt gag tta gca aaa tat ctg aag gaa gtt 1029

Glu Asp Phe Asn Ser Pro Ser Glu Leu Ala Lys Tyr Leu Lys Glu Val

290

295

300

305

gac aaa aac aat aag ttg tac ctt agt tac ttt aac tgg aga aag gat 1077

Asp Lys Asn Asn Lys Leu Tyr Leu Ser Tyr Phe Asn Trp Arg Lys Asp

310

315

320



ttt act gta aac cta cca cgg ttt tgg gaa tca cat gca tgc ctg gca 1125

Phe Thr Val Asn Leu Pro Arg Phe Trp Glu Ser His Ala Cys Leu Ala

325

330

335

tgc gac cat gta aaa agg cat caa gaa tat aag tct gtt ggt aat tta 1173

Cys Asp His Val Lys Arg His Gln Glu Tyr Lys Ser Val Gly Asn Leu

340

345

350

gag aaa tgg ttt tgg aat taaagtgtcc atcattgtca cagtgaaaaa 1221

Glu Lys Trp Phe Trp Asn

355

gattaatgag acataattca agttttcagg ataagaagaa acacgtgca tttggggcac 1281

cgtttaattt tcctgccctc ccttgaggac catgtatatt ttggtgaaat ttttaagaga 1341

tcagaattag caatcactca atttggtttt aaattatcct gtatatatgt gataacgagc 1401

actggaata atttatttgt cactctcatt tataaacatt gtttttacat tttatagttg 1461

actgtaaagt aaatttatga tttacttggt tctacatcaa tcagatcttt aatctatttg 1521

ggagataaaa atacatatcc taaaatatga gggacttttt gccagttatt ataaagtata 1581

gattctagct tgtataatgc taacaaagaa gaattattga atcacttaat tcttaatctc 1641

tttgacttca aagttgaaca ctactgacaa ctgatagagt ttttacttgt accacatttg 1701

tgaaggggag ctaattgatg tagcaaataa gaaagataig aagcagaaat gttattagac 1761

ttcacattca tttttattaa gttgttttagc aaatgtagat tcccaatatt ttaagttaaa 1821

gaaaacaaga attttcagat aaacaattta tatggittta gggagatttg attgtttgtt 1881

ttgtgggttt agtccctaata aatacctaag agaacttttt gatagttccc tttcaaatca 1941

tgaagataac cactatttta aaaataaata atttcctctt ataacaataa aaaaatgata 2001

tcttcaaata caaataaatg tataaattat accatttata gaacgctagt tacttcattc 2061

atttgaaata ttttttccaa agcatccata ttttaagtttt attttactgt atttgttaat 2121

aaatagaagt aaaacttgaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

2170

【0295】

<210> 4

<211> 2822

<212> DNA

<213> human

<220>

<221> CDS

<222> (1289)..(2365)

<400> 4

aagcttttgct actcagagag tctcataatgc ttttaagaaaa actacatagc aaaagaaggt 60

gcttttttta atgttcacat atatttaggt aattaaatga aggataatit ctcccgtttt 120

ttggaaggaa acatctaatag tttctatgct agtttctgtc aaaatttcaa aatactttta 180

tgagtctgaa atttataggc catattatit tcgtaagaga agcaacatga atttcaaag 240

accggtgaga attttatcaa taaacagttt ttgcaaata atttttgtgt tcatagccat 300

aaagaggcat gaatgccgaa gagaaaaaa cttgaaaaca cttttttctt taaaaaaaa 360

gccttcactc atcttttttag ccacaatctg ctaaaattca tgacatcaaa gttgttcttc 420

atgaaatata gccctttttt gagaatttgt ttatttttat aataccgata tcatcttaat 480

acaaagaaaa acttttttaa agcccttagg ctatgtaagt gagaacgttt ttccaatgca 540

aatagaacat ttgattatta catcttggtg gatatcggat gtactaaca attattaaaa 600

gtaacaaag aaaactgtaa gaaaaatata taaataaaaa caaaacactg tgagttttga 660

atttataaaa ttgcctgag tgtacttggt ttttaaaaat gtatcaaac aagagttgcc 720

atttttttac cagatgatta tactaatgca ttgcaaact gtgaaggtaa atttataacg 780

agaaaaacaa aaacataacg tttttaaaaa cagtttagtt ttctaacgaa ttccatctga 840

accacaaagt tatggtacag tctcaatatg cgagtaaata agtgattata tcaactggga 900

gatgttcaca aatctgatgt ggttacaaaa tactaaaaat tttagtcatg gctttagcga 960

tgacagtcta gggttgcca cttttctaca agcaaataaa agtagaactg ttaaggatag 1020

cattgaaaaa aacgttactt gggttgaaga tatgctggtta cttttagaag agtttttggg 1080

aaacttcctt ttgaaagctg tttcttggct ttgaggaaag ttctgtttct ctcaatggtt 1140

tgataacact gaaaaggaaa atgctgttga ttactacttg tttatctcat atttatgatt 1200

ttaaataat ctccaatata tttatgattt tctcttcatt cccaccgcta cctccccttc 1260

tgtctttctc tatttcgtag gaaaaatt atg aca tca aca tcc aaa gga att 1312

Met Thr Ser Thr Ser Lys Gly Ile

1

5

ctt cgc cca ttt tta att gtc tgc att atc ctg ggc tgt ttc atg gca 1360

Leu Arg Pro Phe Leu Ile Val Cys Ile Ile Leu Gly Cys Phe Met Ala

10

15

20

tgt ctt ctc att tac atc aaa cct acc aac agc tgg atc ttc agt cca 1408

Cys Leu Leu Ile Tyr Ile Lys Pro Thr Asn Ser Trp Ile Phe Ser Pro

25

30

35

40

atg gaa tca gcc agc tct gtg ctg aaa atg aaa aac ttc ttt tcc acc 1456

Met Glu Ser Ala Ser Ser Val Leu Lys Met Lys Asn Phe Phe Ser Thr

45

50

55

aaa act gat tat ttt aat gaa act act att ctg gtg tgg gtg tgg cca 1504

Lys Thr Asp Tyr Phe Asn Glu Thr Thr Ile Leu Val Trp Val Trp Pro

60

65

70

ttt ggg cag acc ttt gac ctt aca tcc tgc caa gca atg ttc aac atc 1552

Phe Gly Gln Thr Phe Asp Leu Thr Ser Cys Gln Ala Met Phe Asn Ile

75

80

85

caa gga tgc cat ctc aca acg gac cgt tca ctg tac aac aaa tcc cat 1600

Gln Gly Cys His Leu Thr Thr Asp Arg Ser Leu Tyr Asn Lys Ser His

90

95

100

gca gtt ctg atc cat cac cga gac atc agt tgg gat ctg aca aat tta 1648

Ala Val Leu Ile His His Arg Asp Ile Ser Trp Asp Leu Thr Asn Leu  
105 110 115 120

cct cag caa gct agg cca ccc ttc cag aaa tgg att tgg atg aat ttg 1696

Pro Gln Gln Ala Arg Pro Pro Phe Gln Lys Trp Ile Trp Met Asn Leu  
125 130 135

gaa tca cca act cac act ccc caa aag agt ggc att gag cac ttg ttt 1744

Glu Ser Pro Thr His Thr Pro Gln Lys Ser Gly Ile Glu His Leu Phe  
140 145 150

aac ctg act ctg act tac cgc cgt gat tca gat atc caa gtg cct tat 1792

Asn Leu Thr Leu Thr Tyr Arg Arg Asp Ser Asp Ile Gln Val Pro Tyr  
155 160 165

ggc ttc ttg acg gta agc aca aat ccc ttc gtg ttt gaa gtg cca agc 1840

Gly Phe Leu Thr Val Ser Thr Asn Pro Phe Val Phe Glu Val Pro Ser  
170 175 180

aaa gag aaa ttg gtg tgc tgg gtt gtg agt aac tgg aac cct gag cat 1888

Lys Glu Lys Leu Val Cys Trp Val Val Ser Asn Trp Asn Pro Glu His  
185 190 195 200

gcc aga gtc aag tat tac aat gag cta agc aaa agc att gaa atc cat 1936

Ala Arg Val Lys Tyr Tyr Asn Glu Leu Ser Lys Ser Ile Glu Ile His

205

210

215

acc tac ggg caa gca ttt gga gaa tat gtc aat gat aaa aat ttg att 1984

Thr Tyr Gly Gln Ala Phe Gly Glu Tyr Val Asn Asp Lys Asn Leu Ile

220

225

230

cct acc ata tct gct tgt aaa ttt tat ctt tcc ttt gaa aat tca atc 2032

Pro Thr Ile Ser Ala Cys Lys Phe Tyr Leu Ser Phe Glu Asn Ser Ile

235

240

245

cac aag gat tac atc acg gaa aag cta tac aat gct ttt ctg gct ggc 2080

His Lys Asp Tyr Ile Thr Glu Lys Leu Tyr Asn Ala Phe Leu Ala Gly

250

255

260

tct gta cct gtt gtt ctg gga cca tct agg gaa aac tat gag aat tat 2128

Ser Val Pro Val Val Leu Gly Pro Ser Arg Glu Asn Tyr Glu Asn Tyr

265

270

275

280

att cca gca gat tca ttc att cat gtg gaa gat tat aac tct ccc agt 2176

Ile Pro Ala Asp Ser Phe Ile His Val Glu Asp Tyr Asn Ser Pro Ser

285

290

295



gag cta gca aag tat ctg aag gaa gtc gac aaa aac aat aag tta tac 2224

Glu Leu Ala Lys Tyr Leu Lys Glu Val Asp Lys Asn Asn Lys Leu Tyr  
300 305 310

ctt agt tac ttt aac tgg agg aag gat ttc act gta aat ctt cca cga 2272

Leu Ser Tyr Phe Asn Trp Arg Lys Asp Phe Thr Val Asn Leu Pro Arg  
315 320 325

ttt tgg gaa tca cat gca tgt ttg gct tgc gat cat gtg aaa agg cat 2320

Phe Trp Glu Ser His Ala Cys Leu Ala Cys Asp His Val Lys Arg His  
330 335 340

caa gaa tat aag tct gtt ggt aat tta gag aaa tgg ttt tgg aat 2365

Gln Glu Tyr Lys Ser Val Gly Asn Leu Glu Lys Trp Phe Trp Asn  
345 350 355

taaaattttt catcacttgc acacttgata aatattttga tgagatatca tccaagtatt 2425

gaggataaga agagatgcaa catactactt ttgtgtcaca atttattttt atcaccttct 2485

ctagggtaac gtgtatatatt ttgttgagat ttttaaaagc tcagcatgag caatcattcc 2545

attcggtttt aaattatcct gtatatacct aattatgtgc actggagagt aatttattct 2605

tcattatcat ttgtaaacat tgctttttca catttttgta gttgtccata atgtaagctt 2665

gtggtttgat tattgtttcc acactgatca gctgtttaat ctatttgga aatgaagatg 2725

cacatcttaa agtatgaaaa attttcacta agtattacaa tgtctagttc caactttgca 2785

tactataaca gaggaagaac atgttgcgat tgaattc 2822

[0296]

<210> 5

<211> 2676

<212> DNA

<213> human

<220>

<221> CDS

<222> (295)..(1371)

<400> 5

gcgcgcgcgg cgcagcagct ccagattcac tgctctcccc tgcagctccc cgcgcccccg 60

ccgctgtcgc tgcctcgggtg tccccagcc ccagtcgcgc tcttaggaca gcgccgccac 120

cgccgcctgg ccctgcctgc ctccctgcgc gcgcagccct cgcgagcgcc ccgcatggcg 180

ctttaccctt aggaccgatt tagaatgtaa taactcaagg atttgataat acagtgaagt 240

agtataacaa ctgtctacgt gcttcccatg atatgttctc tatattgaaa aatt atg 297

Met

1

aca tca aca tcc aaa gga att ctt cgc cca ttt tta att gtc tgc att 345

Thr Ser Thr Ser Lys Gly Ile Leu Arg Pro Phe Leu Ile Val Cys Ile

5

10

15

atc ctg ggc tgt ttc atg gca tgt ctt ctc att tac atc aaa cct acc 393

Ile Leu Gly Cys Phe Met Ala Cys Leu Leu Ile Tyr Ile Lys Pro Thr

20

25

30

aac agc tgg atc ttc agt cca atg gaa tca gcc agc tct gtg ctg aaa 441

Asn Ser Trp Ile Phe Ser Pro Met Glu Ser Ala Ser Ser Val Leu Lys

35

40

45

atg aaa aac ttc ttt tcc acc aaa act gat tat ttt aat gaa act act 489

Met Lys Asn Phe Phe Ser Thr Lys Thr Asp Tyr Phe Asn Glu Thr Thr

50

55

60

65

att ctg gtg tgg gtg tgg cca ttt ggg cag acc ttt gac ctt aca tcc 537

Ile Leu Val Trp Val Trp Pro Phe Gly Gln Thr Phe Asp Leu Thr Ser

70

75

80

tgc caa gca atg ttc aac atc caa gga tgc cat ctc aca acg gac cgt 585

Cys Gln Ala Met Phe Asn Ile Gln Gly Cys His Leu Thr Thr Asp Arg

85

90

95

tca ctg tac aac aaa tcc cat gca gtt ctg atc cat cac cga gac atc 633

Ser Leu Tyr Asn Lys Ser His Ala Val Leu Ile His His Arg Asp Ile

100

105

110

agt tgg gat ctg aca aat tta cct cag caa gct agg cca ccc ttc cag 681

Ser Trp Asp Leu Thr Asn Leu Pro Gln Gln Ala Arg Pro Pro Phe Gln

115

120

125

aaa tgg att tgg atg aat ttg gaa tca cca act cac act ccc caa aag 729

Lys Trp Ile Trp Met Asn Leu Glu Ser Pro Thr His Thr Pro Gln Lys  
130 135 140 145

agt ggc att gag cac ttg ttt aac ctg act ctg act tac cgc cgt gat 777

Ser Gly Ile Glu His Leu Phe Asn Leu Thr Leu Thr Tyr Arg Arg Asp  
150 155 160

tca gat atc caa gtg cct tat ggc ttc ttg acg gta agc aca aat ccc 825

Ser Asp Ile Gln Val Pro Tyr Gly Phe Leu Thr Val Ser Thr Asn Pro  
165 170 175

ttc gtg ttt gaa gtg cca agc aaa gag aaa ttg gtg tgc tgg gtt gtg 873

Phe Val Phe Glu Val Pro Ser Lys Glu Lys Leu Val Cys Trp Val Val  
180 185 190

agt aac tgg aac cct gag cat gcc aga gtc aag tat tac aat gag cta 921

Ser Asn Trp Asn Pro Glu His Ala Arg Val Lys Tyr Tyr Asn Glu Leu  
195 200 205

agc aaa agc att gaa atc cat acc tac ggg caa gca ttt gga gaa tat 969

Ser Lys Ser Ile Glu Ile His Thr Tyr Gly Gln Ala Phe Gly Glu Tyr  
210 215 220 225

gtc aat gat aaa aat ttg att cct acc ata tct gct tgt aaa ttt tat 1017

Val Asn Asp Lys Asn Leu Ile Pro Thr Ile Ser Ala Cys Lys Phe Tyr

230

235

240

ttt tcc ttt gaa aat tca atc cac aag gat tac atc acg gaa aag cta 1065

Leu Ser Phe Glu Asn Ser Ile His Lys Asp Tyr Ile Thr Glu Lys Leu

245

250

255

tac aat gct ttt ctg gct ggc tct gta cct gtt gtt ctg gga cca tct 1113

Tyr Asn Ala Phe Leu Ala Gly Ser Val Pro Val Val Leu Gly Pro Ser

260

265

270

agg gaa aac tat gag aat tat att cca gca gat tca ttc att cat gtg 1161

Arg Glu Asn Tyr Glu Asn Tyr Ile Pro Ala Asp Ser Phe Ile His Val

275

280

285

gaa gat tat aac tct ccc agt gag cta gca aag tat ctg aag gaa gtc 1209

Glu Asp Tyr Asn Ser Pro Ser Glu Leu Ala Lys Tyr Leu Lys Glu Val

290

295

300

305

gac aaa aac aat aag tta tac ctt agt tac ttt aac tgg agg aag gat 1257

Asp Lys Asn Asn Lys Leu Tyr Leu Ser Tyr Phe Asn Trp Arg Lys Asp

310

315

320

ttc act gta aat ctt cca cga ttt tgg gaa tca cat gca tgt ttg gct 1305

Phe Thr Val Asn Leu Pro Arg Phe Trp Glu Ser His Ala Cys Leu Ala

325

330

335

tgc gat cat gtg aaa agg cat caa gaa tat aag tct gtt ggt aat tta 1353

Cys Asp His Val Lys Arg His Gln Glu Tyr Lys Ser Val Gly Asn Leu

340

345

350

gag aaa tgg ttt tgg aat taaaattttt catcacttgc acacttgata 1401

Glu Lys Trp Phe Trp Asn

355

aatattttga tgagatatca tccaagtatt gaggataaga agagatgcaa catactactt 1461

ttgtgtcaca atttattttt atcacccctct ctagggtaac gtgtatatatt tgggtggagat 1521

ttttaaaagc tcagcatgag caatcattcc attcggtttt aaattatcct gtatatacct 1581

aattatgtgc actggagagt aatttattct tcattatcat ttgtaaacat tgctttttca 1641

catttttgta gttgtccata atgtaagctt gtggtttgat tattgtttcc aactgatca 1701

gctgtttaat ctatttggga aatgaagatg cacatcttaa agtatgaaa attttacta 1761

agtattacaa tgtctagttc caactttgca tactataaca gaggaagaac atgttgcgat 1821

tgaattctaa cctctttgac tcctaagatg aatgaagtgt ataactgtct ctatttgatc 1881

tatttttttt accgttttat cacatttggt aaggtgaaat tattcatgga gtgaataaga 1941

aagatatgaa gcagaactgt tctattcagg aagctattag acttctcatt tattttcatt 2001

aagctgattt gcagctactt atttctcatgg tcttaaatta aattattcaa gtatttttaa 2061

atatccaatt tgttgtgatt ttacgacact gggaagtaat cccaataata cttagaaaa 2121

tctaagacag ttctttctgc tactgatgac actcattgtc ataataaaac aaataatttc 2181

ctcaaataac aaagaaaaat gataacctata aatatattta taaatgggtgt catttatgaa 2241

caatgtttta ttatgtatca atttaagatt tttttctgaa gccctaatat ttaaaatggc 2301



cttattttac catatggata taagatttgg ctcataatga tgagccctat catttgattt 2361

gagttctatc atttaagaga gcctaaataa aattatcatc aaggtattaa atataagacg 2421

ttaaataataa taaagtgggg atatatagaa aacacacagt gttagcacag agtaagatct 2481

caatgcacat ttgttggatg aataaataaa tgcaattgaa ttcccagaaa aatgattggt 2541

tcaaggaagt gacagttcta ctttagaagt actaattgga gatgactttt atatcccat 2601

ttggttaatta ttcatacata gcacatatga ccatgatgtt cagggttta tagaaccaaa 2661

taaacctacc attac

2676

【0 2 9 7】

<210> 6

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 6

ctttagagca c

11

[0298]

<210> 7

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7

ctctaaag

8

[0299]

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8

ctggattcta tccagtgcaa ggcgagggtt tg

32

【 0 3 0 0 】

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 9

ctgaattctc atcgttgaa ccagtctgcc aag

33

【 0 3 0 1 】

<210> 10

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 10

ctgaattcac agcttctttg cagctccttc g

31

【 0 3 0 2 】

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 11

ctaagcttgt gtaaaacgca gctcagtaac ag

32

【 0 3 0 3 】

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 12

cagctgggat ctgactaact tacc

24

【 0 3 0 4 】

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 13

ccacatgaat gaatgaatca gctgg

25

【 0 3 0 5 】

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 14

gatatcgctg cgctggctgt cgac

24

【0306】

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 15

caagaaggaa ggctggaaaa gagc

24

【0307】

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 16

gcttcttgac ggtgagcaca aatc

24

【 0 3 0 8 】

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 17

tgcttgcca taggtgtgga tttc

24

【 0 3 0 9 】

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 18

gcttcttgac ggtgagcaca aatc

24

【0310】

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 19

tgcttgcca taggtgtgga tttc

24

【0311】

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 20

gattcccacc atatctactt gtaa

24



【0312】

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 21

tgaatcagct ggaatataat tctc

24

【0313】

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 22

aggccaccct ttcagaaatg

20

【0314】

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 23

agttttccct agatggaccc

20

【0315】

<210> 24

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 24

ctgaattctg gctgggatcg cttagaatg tg

32

【0316】

<210> 25

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 25

ctgaattcaa atgaatgaag taactagcgt tc

32

【 0 3 1 7 】

<210> 26

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 26

aaattatgac atcaacatcc aaagg

25

【 0 3 1 8 】

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 27

ccaacagact tatattcttg atgcc

25

【図面の簡単な説明】

【図1】は、コントロールプラスミド (pAMo)、マウスFuc-TIX発現プラスミド (pAMo-mFT9)、マウスFuc-TIV発現プラスミド (pAMo-mFT4)、あるいはヒトFuc-TVI発現プラスミド (pAMo-hFT6) を導入したNamalwa細胞について、抗ルイスx糖鎖抗体 (PM-81、73-30)、抗ルイスy糖鎖抗体 (AH-6)、または抗シアリルルイスx糖鎖抗体 (KM93) を用いて間接蛍光抗体染色を行なった後、FACSを用いて解析した結果を示した図である。影をつけたヒストグラムは、コントロールプラスミドを導入したNamalwa細胞のものである。

【図2】は、コントロールプラスミド (pAMo)、マウスFuc-TIX発現プラスミド (pAMo-mFT9)、ヒトFuc-TIV発現プラスミド (pAMo-FT4)、あるいはヒトFuc-TVII発現プラスミド (pAMo-FT7) を導入したNamalwa KJM-1細胞について、抗シアリルルイスx糖鎖抗体 (CSLEX-1, KM93) を用いて間接蛍光抗体染色を行なった後、FACSを用いて解析した結果を示した図である。コントロールは、一次抗体の代わりにA-PBSを使用したもの。

【図3】は、コントロールプラスミド (pCDM8)、マウスFuc-TIX発現プラスミド (pCDM8-mFT9)、またはヒトFuc-TIII発現プラスミド (pCDM8-Le) を導入したCOS-1細胞細胞について、

抗リス a 糖鎖抗体 (7LE) を用いて間接蛍光抗体染色を行なった後、FACS を用いて解析した結果を示した図である。影をつけたヒストグラムは、コントロールプラスミドを導入した COS-1 細胞のものである。

【図 4】は、マウス *Fuc-TIX* 転写物の発現分布を調べるために、マウスの各組織由来の Poly (A)<sup>+</sup>RNA に対してノーザンハイブリダイゼーションを行った結果を示した電気泳動の図である。シグナルがみられた脳と腎臓についての結果を示す。

【図 5】は、定量的 RT-PCR 法を用いて、マウスの各組織におけるマウス *Fuc-TIX* 転写物の発現量を調べた結果を示した図である。

比較のために、マウス *Fuc-TIX* 転写物およびマウス  $\beta$ -アクチン転写物についても同様に示した。

A. は RT-PCR 後のサンプルを、アガロースゲル電気泳動に供した時のパターンを示した電気泳動の図である (a. は *Fuc-TIX* 転写物、b. は *Fuc-TIV* 転写物の発現量を調べたものである)。

それぞれのゲルでみられる下のバンドが内部コントロール由来のバンド、上のバンドが *Fuc-TIX* 転写物または *Fuc-TIV* 転写物由来のバンドである。スタンダードプラスミドを用いて検量線を作成し、マウス *Fuc-TIX* 転写物、マウス *Fuc-TIV* 転写物、およびマウス  $\beta$ -アクチン転写物の発現量をそれぞれ数値化した図を B. に示した。発現量は、本文中に記載した方法で作製した一本鎖 cDNA 溶液 1  $\mu$ l 中での発現量である。

検量線を作成するために用いたスタンダードプラスミドの量をスタンダード DNA として A. 中に示した。(1) は 40 fg、(2) は 20 fg、(3) は 10 fg、(4) は 5 fg、(5) は 2.5 fg、(6) は 1.25 fg である。

【図 6】は、マウス *Fuc-TIX* 転写物の発現分布を調べるために、マウスの脳組織の切片に対して *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果を示した写真である。ここに示した結果は、配列番号 20 および 21 に示したプライマーを使用して作製したプローブを用いた時のものである。アンチセンスプローブを用いた時には、神経細胞体で *Fuc-TIX* 転写物の発現がみられた

(A)。一方、ネガティブコントロールとしてセンスプローブを用いた時には、シグナルはみられなかった(B)。

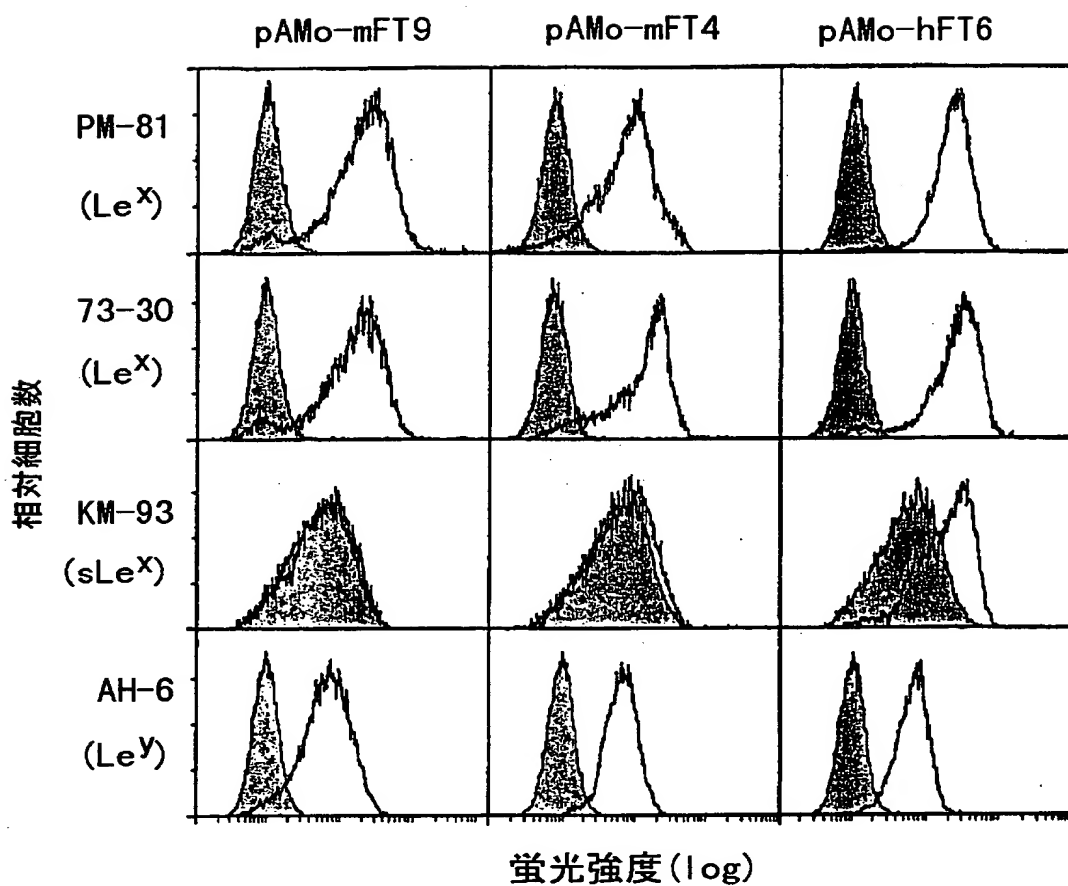
【図7】は、プラスミドpBS-hFT9(S2)の構造を示す。

図中のcDNAおよびApは、それぞれヒトFuc-TIX cDNAおよびアンピシリン耐性遺伝子を表わしている。

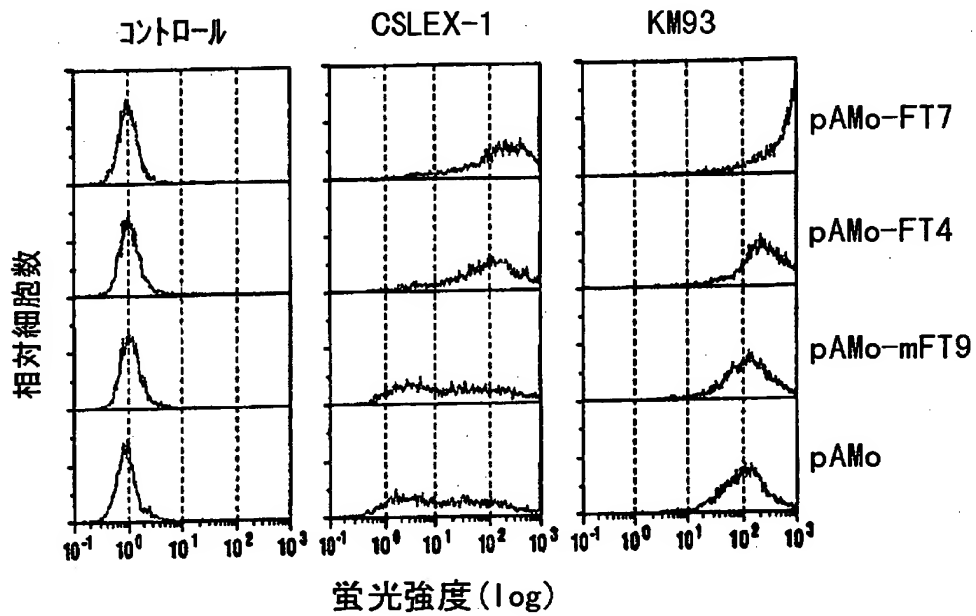
【書類名】

図面

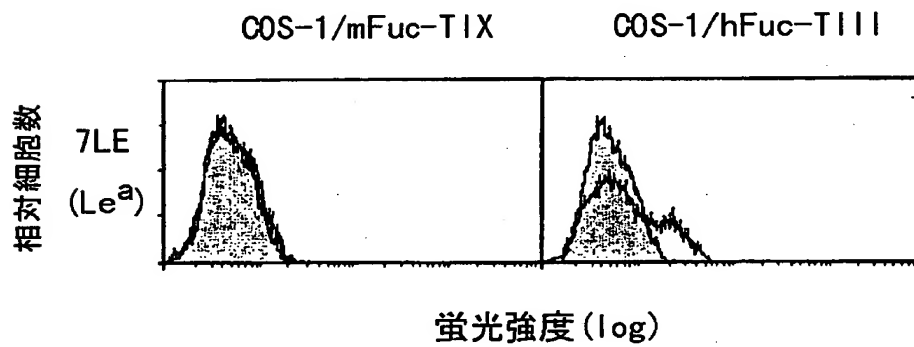
【図 1】



【図2】

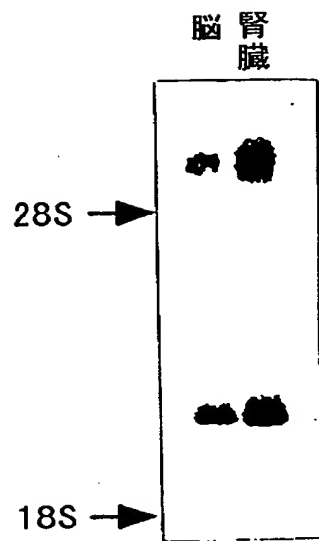


【図3】



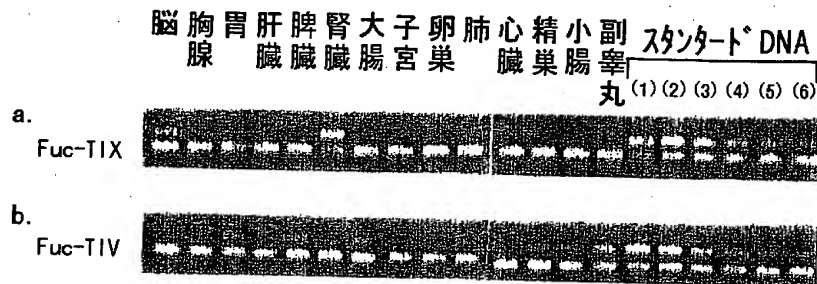


【図4】

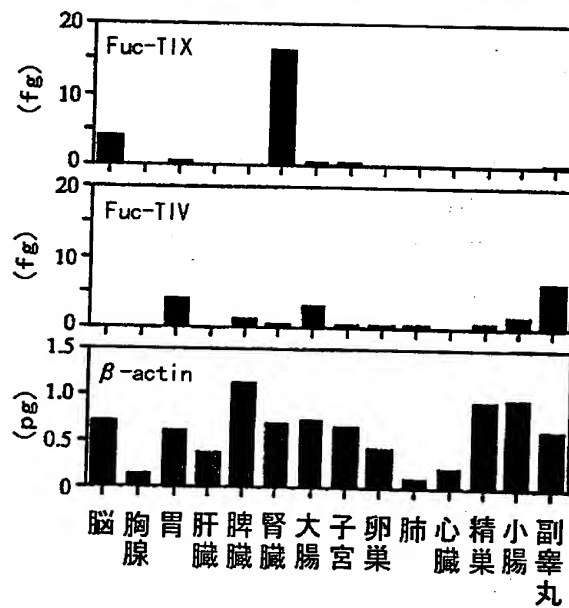


【図5】

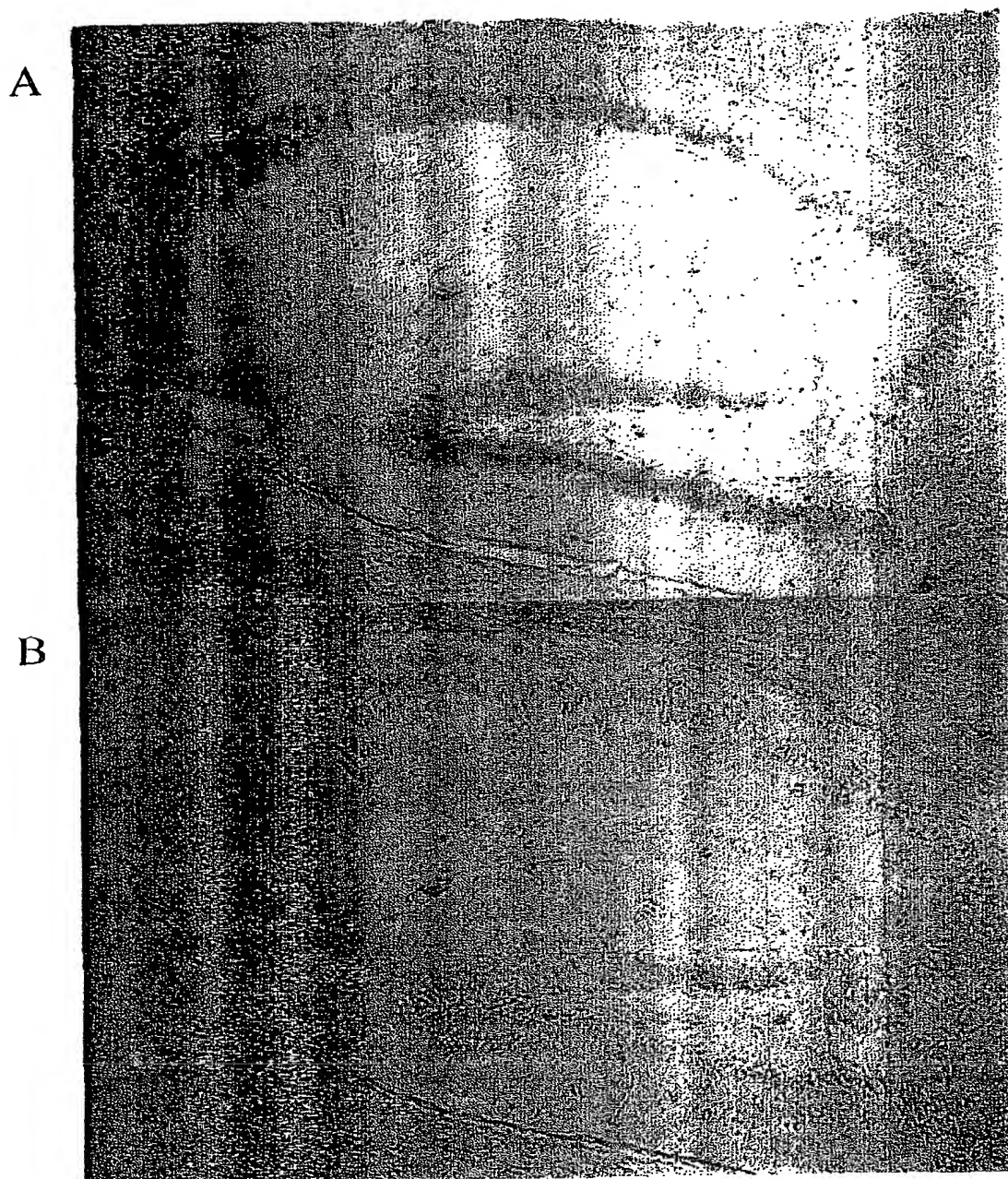
A.



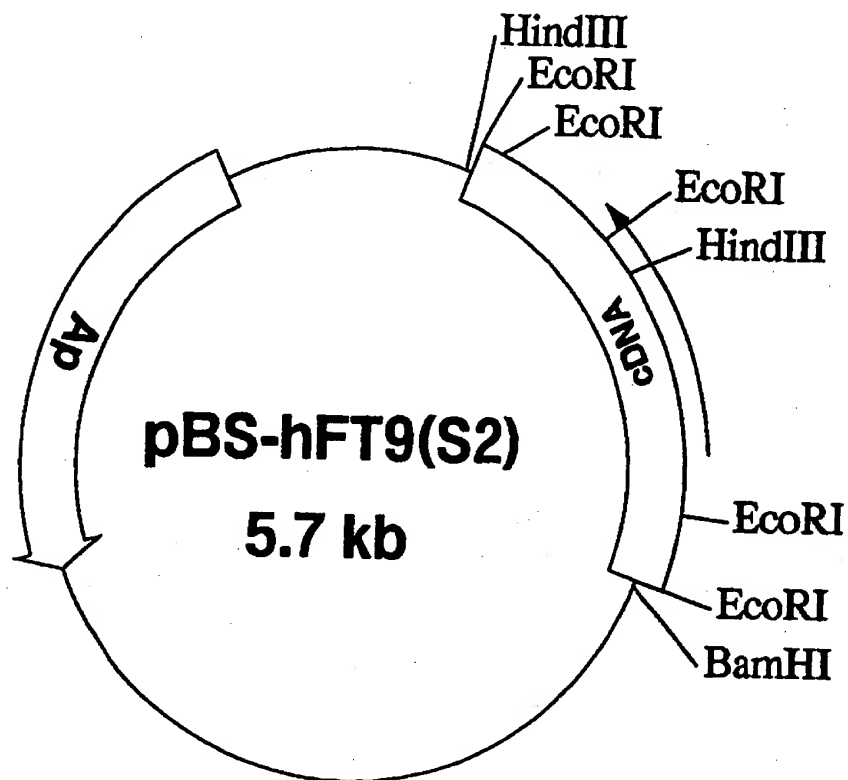
B.



【図6】



【図7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性を有するポリペプチドを利用し、抗炎症、抗感染症、または癌転移抑制等の医薬品、乳製品等の食品、タンパク質の改善法、および脳疾患、腎疾患、または癌等の疾患の診断法を提供する。

【解決手段】 本発明によれば、新規 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAの製造法、該DNAを組み込んで得られる組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法および免疫染色法、該ポリペプチドまたは該形質転換体を用いたFuc含有糖鎖の製造法、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質のスクリーニング法、該ポリペプチドの有する活性を変動させる物質のスクリーニング法および該DNAあるいは該抗体を用いた脳疾患、腎疾患または癌等の疾患の診断法を提供することができる。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000001029

【住所又は居所】

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

【氏名又は名称】

協和醗酵工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001029]

1. 変更年月日	1990年 8月 6日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区大手町1丁目6番1号
氏 名	協和醗酵工業株式会社

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**